

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2022. Т. 67, № 1

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2022. Т. 67, № 1

Журнал основан в 1956 г. как «Весці Акадэміі навук БССР. Серыя біялагічных навук»,
с 1992 г. – «Весці Акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук»,
с 1998 г. – современное название

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 395 от 18 мая 2009 г.

*Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований, включен в базу данных
Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)*

Главный редактор

Владимир Иванович Торчик – Отделение биологических наук Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

М. Е. Никифоров (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

В. И. Парфенов (*заместитель главного редактора*) – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

В. Г. Колосовская – *ведущий редактор журнала*

И. Д. Волотовский – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

А. Н. Евтушенко – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

А. В. Кильчевский – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

- Э. И. Коломиец** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Н. А. Ламан** – Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- А. Г. Лобанок** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- В. Е. Падутов** – Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь
- В. Н. Решетников** – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- В. В. Титок** – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- Л. В. Хотылева** – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- В. М. Шкуматов** – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Р е д а к ц и о н н ы й с о в е т

- В. Ф. Багинский** – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь
- А. Баршевский** – Даугавпилский университет, Даугавпилс, Латвийская Республика
- Я. Б. Блюм** – Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина
- В. Е. Гайдук** – Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, Брест, Республика Беларусь
- Ю. Ю. Дгебуадзе** – Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
- Н. А. Колчанов** – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация
- В. В. Кузнецов** – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
- В. Олех-Пяэцка** – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
- О. Н. Пугачев** – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- А. И. Рапопорт** – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
- И. А. Тихонович** – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация
- В. В. Швартау** – Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

Адрес редакции:

*ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Сайт: vestibio.belnauka.by*

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2022. Т. 67, № 1.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Н. И. Кацуба*

Подписано в печать 11.01.2022. Выход в свет 26.01.2022. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 74 экз. Заказ 6.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,67 руб., ведомственная подписка – 29,77 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2022

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2022, vol. 67, no. 1

The Journal was founded in 1956 under the title
“Proceedings of the Academy of Sciences of BSSR. Biological series”,
since 1992 – “Proceedings of the Academy of Sciences of Belarus. Biological series”,
since 1998 it comes under its actual title

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The Journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus
in the State Registry of Mass Media, reg. no. 395

*The Journal is included in the List of Journals for Publication of the results
of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the database
of Russian Science Citation Index (RSCI)*

Editor-in-Chief

Vladimir I. Torchyk – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

Mikhail E. Nikiforov (*Associate Editor-in-Chief*) – Scientific and Practical Center of the National Academy
of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus

Viktor I. Parfyonov (*Associate Editor-in-Chief*) – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the
National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Valentina G. Kolosovskaya – *Managing Editor*

Anatoli N. Evtushenkov – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Lyubov V. Khotyleva – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Alexander V. Kilchevsky – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic
of Belarus

Emiliya I. Kolomiets – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus

Nikolai A. Laman – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences
of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Anatoli G. Lobanok – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus

Vladimir E. Padutov – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Vladimir N. Reshetnikov – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir M. Shkumatov – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir V. Titok – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Igor D. Volotovskii – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

Vladimir F. Baginski – F. Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus
Arvids Barsevskis – Daugavpils University, Daugavpils, Republic of Lithuania
Yaroslav B. Blume – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Yuri Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Vasilii E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Wanda Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland
Oleg N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
Alexander I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic
Victor V. Schwartz – Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Igor A. Tikhonovich – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation

Address of the Editorial Office:

*1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Phone: +375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Website: vestibio.belnauka.by*

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2022, vol. 67, no. 1.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *N. I. Kashuba*

Sent for press 11.01.2022. Output 26.01.2022. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14.88. Publisher's signatures 16.4. Circulation 74 copies. Order 6.
Number price: individual subscription – 12.67 byn., departmental subscription – 29.77 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka".
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer,
distributor of printing editions no. 1/18 dated of August 2, 2013. License for press no. 02330/455 dated of December 30, 2013.
Address: F. Skorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2022

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

ЗМЕСТ

Чижик О. В., Деева А. М., Решетников В. Н. Биологически активные соединения плодов и листьев <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	7
Гетко Н. В., Бурчик Н. А., Баркун М. И., Титок В. В. Влияние спектрального состава света на морфогенез культивируемой в оранжерее эпифитной орхидеи <i>Cattleya labiata</i> Lindl.	16
Рупасова Ж. А., Яковлев А. П., Савосько И. В., Белый П. Н., Домаш В. И., Азизбекян С. Г., Лиштван И. И., Гончарова Л. В. Генотипические особенности ответной реакции антиоксидантного комплекса плодов голубики (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) на применение минеральных и органических удобрений в условиях выработанного торфяника низинного типа	24
Адамцевич Н. Ю., Феськова Е. В., Леонтьев В. Н., Жаворонок И. П., Ерофеева А.-М. В., Маньковская С. В., Титок В. В. Ранозаживляющие свойства гелевой субстанции на основе комплекса флавоноидов из экстрактов бессмертника песчаного (<i>Helichrysum arenarium</i> L.) и воробейника лекарственного (<i>Lithospermum officinale</i> L.)	33
Головченко Л. А., Володько И. К., Дишук Н. Г., Тимофеева В. А., Стахович С. О., Ковалев Я. В. Фитосанитарное состояние растений рода <i>Rhododendron</i> L. коллекционного фонда Центрального ботанического сада НАН Беларуси	43
Наумович Н. И., Алещенкова З. М., Ананьева И. Н., Сафронова Г. В. Выделение и идентификация микроорганизмов, устойчивых к засолению почв.....	54
Самович Т. В., Вязов Е. В., Гончарик Р. Г., Печёнкина Е. И., Козел Н. В. Каротиногенез в клетках <i>Haematococcus pluvialis</i> при совместном действии избытка NaCl в среде культивирования и света высокой интенсивности.....	66
Алехнович А. В. Возрастная структура и плодовитость популяции широкопалого рака (<i>Astacus astacus</i>) в водоемах заброшенных карьеров	75
Федосенко Е. И. Структура и сезонная динамика видового разнообразия пауков в сосняках черничных и мшистых заказника «Прибужское Полесье».....	84
Веремеенко Е. Г., Шапиро М. А., Наумовская О. А., Ашманкевич Д. Д., Максимова Н. П. Протеомное профилирование штаммов-продуцентов феназиновых соединений <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	91
Сверчкова Н. В., Коломиец Э. И. Критерии отбора и характеристика штаммов спорообразующих бактерий рода <i>Bacillus</i> – основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для животноводства	105

АГЛЯДЫ

Волотовский И. Д., Пинчук С. В. Трёхмерная 3D-биопечать: основы технологии и ее использование в интересах биологии и медицины	114
--	-----

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ

Анатолий Иванович Зинченко (К 75-летию со дня рождения).....	127
---	-----

CONTENTS

Chizhik O. V., Deeva A. M., Reshetnikov V. N. Biologically active compounds of berries and leaves of <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	7
Hetko N. V., Burchik N. A., Barkun M. I., Titok V. V. Influence of the spectral composition of light on the morphogenesis of the epiphytic orchid <i>Cattleya labiata</i> Lindl. cultivated in the greenhouse.....	16
Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Savosko I. V., Bely P. N., Domash V. I., Azizbekyan S. G., Lishtvan I. I., Goncharova L. V. Genotypic features the response of the antioxidant complex of blueberry fruits (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) to the use of mineral and organic fertilizers on lowland peatland.....	24
Adamtsevich N. Yu., Feskova A. V., Leontiev V. N., Zhavoronok I. P., Yerofeyeva A.-M. V., Mankovskaya S. V., Titok V. V. Wound-healing effect of the gel substance based on the flavonoids complex from extracts of the everlasting (<i>Helichrysum arenarium</i> L.) and the littlewale (<i>Lithospermum officinale</i> L.)	33
Golovchenko L. A., Volodko I. K., Dishuk N. G., Timofeeva V. A., Stahovich S. O., Kovalev Ya. V. Common problems of <i>Rhododendron</i> L. in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus	43
Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V. Isolation and identification of micro-organism's resistant to soil salinization	54
Samovich T. V., Viazau Ya. V., Goncharik R. G., Pechenkina E. I., Kozel N. V. Carotenogenesis in <i>Haematococcus pluvialis</i> cells under the combined action of excess of NaCl in the culture medium and high light intensity	66
Alekhnovich A. V. Age structure and fecundity of the noble crayfish populations in abandoned quarries	75
Fedosenko E. I. Structure and seasonal dynamics of diversity of spiders in the bilberry and mossy pine forests of the reserve "Pribuzhskoye Polesie"	84
Verameyenka K. G., Shapira M. A., Naumouskaya V. A., Ashmankevich D. D., Maximova N. P. Proteomic analysis of <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strains capable of phenazine compounds overproduction.....	91
Sverchkova N. V., Kolomiets E. I. Selection criteria and characterization of sporulating bacterial strains of genus <i>Bacillus</i> – the basis of probiotic preparations and feed additives for livestock	105

REVIEWS

Volotovskii I. D., Pinchuk S. V. Three-dimensional 3D-bioprinting: the basis of technology and its application in the interests of biology and medicine	114
--	-----

SCIENTISTS OF BELARUS

Anatoly Ivanovich Zinchenko (To the 75th Anniversary).....	127
---	-----

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.13; 547.97; 577.11; 57.087.1

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-7-15>

Поступила в редакцию 01.09.2021

Received 01.09.2021

О. В. Чижик, А. М. Деева, В. Н. Решетников*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ПЛОДОВ И ЛИСТЬЕВ
VACCINIUM CORYMBOSUM L.**

Аннотация. Изучено суммарное содержание фенольных соединений и антоцианов в их составе, а также определен уровень антирадикальной активности (АРА) в плодах и листьях различных сортов *Vaccinium corymbosum* L.

Максимальное содержание фенольных соединений в плодах отмечено у сортов Blueray, Bluerose, Caroline Blue, Herbert, Jersey, Nelson. В исследованных таксонах доля антоциановых пигментов в составе фенольных соединений составляла от 0,01 до 0,8 % в зеленых плодах и от 22 до 52 % в зрелых. Сорта Earlyblue, Duke, Bluecrop, Bluegold характеризовались наибольшим количеством фенольных соединений в листьях.

Зафиксировано наличие тесной положительной корреляционной связи между уровнем АРА и содержанием вторичных метаболитов фенольной природы. Выявлены отличия в уровне накопления фенольных веществ у сортов голубики, обусловленные способом получения посадочного материала – методом *in vivo* или *in vitro*.

Установлено, что для определения сортоотчетствия представителя рода *Vaccinaceae* наряду с генетическими паспортами можно использовать протеомный профиль растений голубики высокорослой.

Ключевые слова: *Vaccinium corymbosum* L., фенольные соединения, антоцианы, антирадикальная активность, вторичные метаболиты, *in vivo*, *in vitro*, протеомный профиль

Для цитирования: Чижик, О. В. Биологически активные соединения плодов и листьев *Vaccinium corymbosum* L. / О. В. Чижик, А. М. Деева, В. Н. Решетников // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 7–15. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-7-15>

Olga V. Chizhik, Alla M. Deeva, Vladimir N. Reshetnikov*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS OF BERRIES AND LEAVES OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* L.**

Abstract. Quantitative content of the sum of phenolic compounds and anthocyanins in their composition were study. The level of antiradical activity (ARA) in the berries and leaves of *Vaccinium corymbosum* L. was measured.

The maximum content of the sum of phenolic compounds was observed in Blueray, Bluerose, Caroline Blue, Herbert, Jersey, Nelson cultivars. In the cultivars which have been studied the quantity of anthocyanins in the composition of phenolic compounds ranged from 0.01 to 0.8 % in green berries, and from 22 to 52 % in mature ones. Earlyblue, Duke, Bluecrop, Bluegold cultivars were characterized by the greatest quantity of phenolic compounds in leaves.

The presence of a close positive correlation between the level of antiradical activity and the content of secondary metabolites of phenolic nature was determined. The differences in phenolic substances accumulation in blueberry cultivars obtained by *in vivo* and *in vitro* methods were revealed.

It was shown that the proteomic profile of the highbush blueberry plants together with genetic passports can being used to determine the cultivar's identity of *Vaccinium corymbosum* L.

Keywords: *Vaccinium corymbosum* L., phenolic compounds, anthocyanin, anti-radical activity, second metabolites, *in vivo*, *in vitro*, proteomic profile

For citation: Chizhik O. V., Deeva A. M., Reshetnikov V. N. Biologically active compounds of berries and leaves of *Vaccinium corymbosum* L. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 7–15 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-7-15>

Введение. Одним из путей повышения качества питания является использование растительных культур с высокими вкусовыми и лечебно-профилактическими характеристиками, а также продуктов их переработки.

Для производства ценных биологически активных веществ (БАВ) важное значение имеет выбор растения-производителя. С учетом именно этого аспекта, а также перспектив интродукцион-

ного процесса внимание специалистов было обращено на растения из рода *Vaccinium*, в частности на голубику высокорослую (*Vaccinium corymbosum* L.), которая характеризуется значительным содержанием вторичных метаболитов.

Вторичные метаболиты растений – богатейший источник полезных для человека веществ, прежде всего медицинского назначения. Полифенольные соединения играют важную роль в физиологических процессах растения (энергетическом обмене, фотосинтезе, дыхании, защитных реакциях), являются активаторами/ингибиторами отдельных ферментов. К группе флавоноидов относятся и антоцианы, которые выполняют разнообразные функции в растениях, активно участвуя в окислительно-восстановительных процессах и в защите от абиотических и биотических стрессов [1, 2]. Антоцианы представляют интерес в первую очередь как вещества, обладающие антиоксидантными, противовоспалительными, антиканцерогенными, антидиабетическими свойствами и способствующие снижению когнитивных расстройств [3, 4], а кроме того, они представляют интерес и как естественные красители [4–6]. Наличие такого разнообразного набора функций антоцианов вызывает необходимость их сравнительного изучения у сортов *Vaccinium corymbosum* L.

Цель исследования – изучить изменение суммарного содержания фенольных соединений (в том числе антоцианов) и их состава в вегетативных и генеративных органах голубики высокорослой, уровня антирадикальной активности в процессе созревания плодов, дать первичную характеристику протеома таксонов голубики (*in vivo* и *in vitro*), отобранных по наибольшему содержанию биологически активных веществ.

Объекты и методы исследования. Образцы голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum* L.) были собраны на опытном участке отраслевой лаборатории интродукции и технологии ягодных растений ЦБС НАН Беларуси (г. Ганцевичи, южная агроклиматическая зона Республики Беларусь, заведующий лабораторией – кандидат биологических наук Н. Б. Павловский). Стабилизированные *in vitro* культуры голубики высокорослой были получены в отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси старшим научным сотрудником В. Л. Филипеней (заведующий лабораторией О. В. Чижик).

Образцы замораживали при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для проведения анализа отбирали среднюю пробу в 15–20 г образца каждого таксона, которые затем гомогенизировали. Для проведения экстракции использовали навеску в 3–5 г.

Количественное определение суммарного содержания антоциановых пигментов проводили методом рН-дифференциальной спектрофотометрии [7, 8]. Результаты выражали в миллиграмм-эквивалент цианидин-3-глюкозида в 100 г сухого веса (СВ). Суммарное содержание фенольных соединений в плодах и листьях оценивали, используя модифицированный метод Фолина–Чокальтеу [9]. Содержание антоциановых пигментов листьев определяли в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид (в %) согласно Фармакопее [10]. Антирадикальные свойства голубики оценивали в системе с катион-радикалами АБТС+• [11]. Белки из листовой ткани выделяли методом ТХУ/ацетоновой преципитации по Амме с соавт. [12] с нашими модификациями. Вертикальный электрофорез белков проводили по методике, приведенной в работе [13].

Результаты и их обсуждение. В результате анализа полученных данных было показано, что содержание всех биологически активных соединений фенольной природы в процессе созревания плодов голубики высокорослой повышается (рис. 1–3).

В зеленых плодах исследуемых сортов содержание фенольных соединений колебалось от $629,0 \pm 42,6$ мг/100 г СВ (сорт Caroline Blue) до $895,5 \pm 33,1$ мг/100 г СВ (сорт Nelson) (рис. 1), а суммарное содержание антоциановых пигментов в их составе было менее 10 мг/100 г СВ и составляло от 0,009 до 0,777 % (рис. 2). В зрелых плодах содержание фенольных соединений было в пределах от $1403,2 \pm 47,0$ мг/100 г СВ (сорт Bluecrop) до $2347,8 \pm 81,5$ мг/100 г СВ (сорт Herbert) (см. рис. 1), а содержание антоциановых пигментов составляло от $278,3 \pm 5,0$ мг/100 г СВ (сорт Northland) до $967,7 \pm 27,7$ мг/100 г СВ (сорт Herbert) (рис. 2).

Исходя из полученных данных, можно выделить группу сортов голубики высокорослой (Blueray, Bluerose, Caroline Blue, Herbert, Jersey, Nelson), в плодах которых уровень накопления антоцианов был весьма высоким и составлял на момент созревания более 600 мг/100 г СВ. Доля

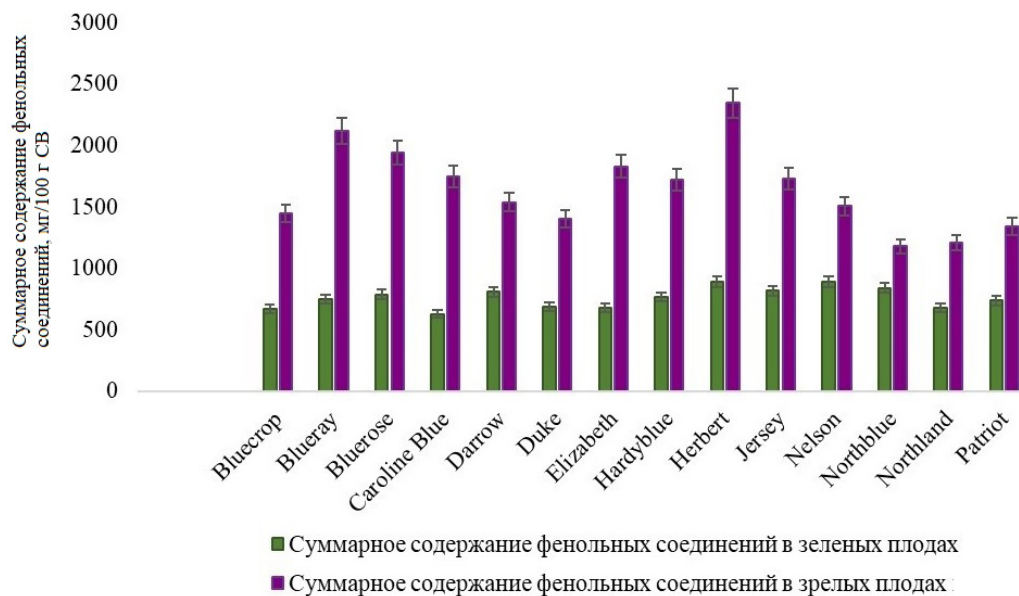


Рис. 1. Суммарное содержание фенольных соединений в зеленых и спелых плодах разных сортов *Vaccinium corymbosum* L., г

Fig. 1. Total content of phenolic compounds in green and ripe berries of different varieties of *Vaccinium corymbosum* L., g

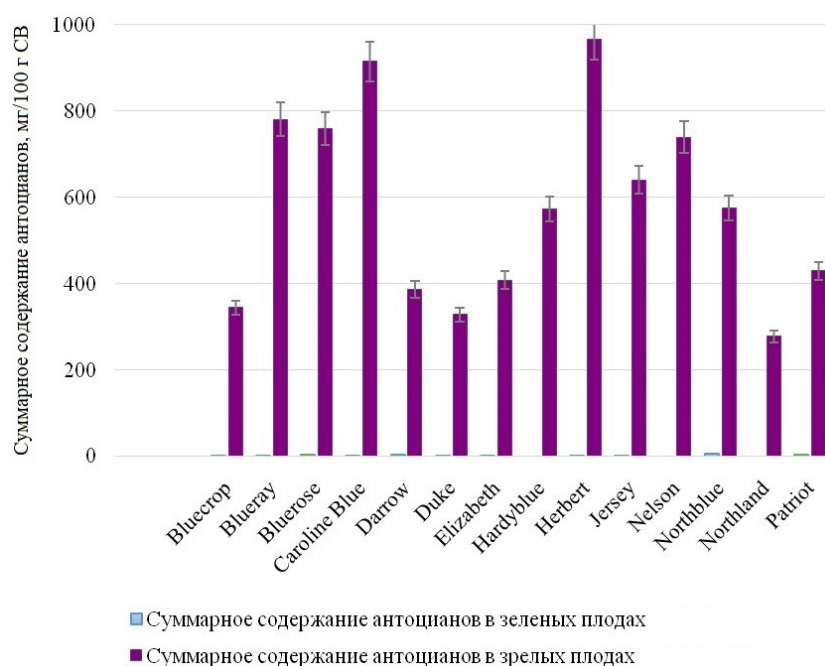


Рис. 2. Суммарное содержание антоциановых пигментов в зеленых и спелых плодах разных сортов *Vaccinium corymbosum* L.

Fig. 2. Total content of anthocyanin pigments in green and ripe berries of different varieties of *Vaccinium corymbosum* L.

антоциановых пигментов в составе фенольных соединений у исследованных образцов составляла от 22 до 52 % (см. рис. 1, 2).

Кроме того, установлено, что в процессе созревания плодов антирадикальная активность (АРА) в модельной системе с катион-радикалами АБТС⁺⁺ повышается в среднем в 1,4–4,7 раза (рис. 3).

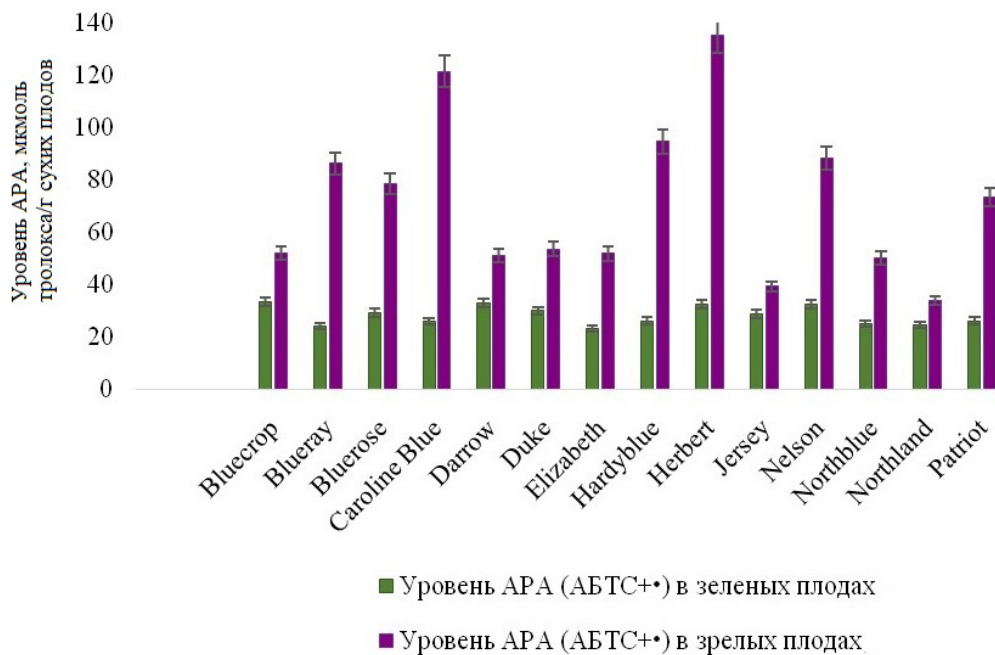


Рис. 3. Изменение уровня АРА в системе с катион-радикалами АБТС+• в зеленых и спелых плодах разных сортов *Vaccinium corymbosum* L.

Fig. 3. Change in the level of antiradical activity in the system with АБТС+• cation radicals in green and ripe berries of different varieties of *Vaccinium corymbosum* L.

Обнаружена значимая корреляционная связь между показателями АРА в модельных системах с АБТС+• катион-радикалами и содержанием фенольных соединений в зрелых ягодах голубики (рис. 4). Коэффициенты корреляции являлись значимыми на основании того, что расчетные значения критерия Стьюдента во всех корреляционных полях превышали табличные (количество степеней свободы 12 при уровне значимости $p < 0,05$) [14].

Поскольку полифенольные соединения играют важную роль в физиологических процессах растения, включая стрессоустойчивость, проведен сравнительный анализ количественного содержания полифенольных соединений (в том числе антоцианов) и уровня АРА не только в плодах, но и в листьях голубики высокорослой, выращенной *in vivo* (маточник, г. Ганцевичи), а также в листьях укорененных растений, полученных методом *in vitro*.

В результате эксперимента установлено, что суммарное содержание антоциановых пигментов в пересчете на цианидин-3,5-дигликозид колебалось в пределах от $11,7 \pm 0,05$ % (сорт Elizabeth) до $15,0 \pm 0,23$ % (сорт Bluegold).

Согласно полученным данным, доля антоцианов в осенних листьях выше, что может быть связано с процессами трансформации световой энергии антоцианами и увеличением эффективности фотосинтетических процессов в осенний период.

Установлено, что суммарное содержание фенольных соединений в листьях растений голубики высокорослой *in vivo* находилось в пределах от $46,3 \pm 1,53$ до $146,4 \pm 7,20$ –мг/г СВ в пересчете на галловую кислоту.

Следует также отметить, что сорта Earlyblue и Duke характеризовались наибольшим количеством фенольных соединений, сорт Denise Blue – наименьшим. Та же закономерность наблюдалась и при измерении АРА (табл. 1).

При построении корреляционных графиков зависимости АРА – содержание фенольных соединений коэффициенты корреляции через 1 и 6 мин проведения эксперимента составили 0,96 и 0,97 соответственно ($T_{\text{крит. Стьюдента}} > 6; p < 0,05$), что свидетельствует о тесной взаимосвязи между данными показателями [14].

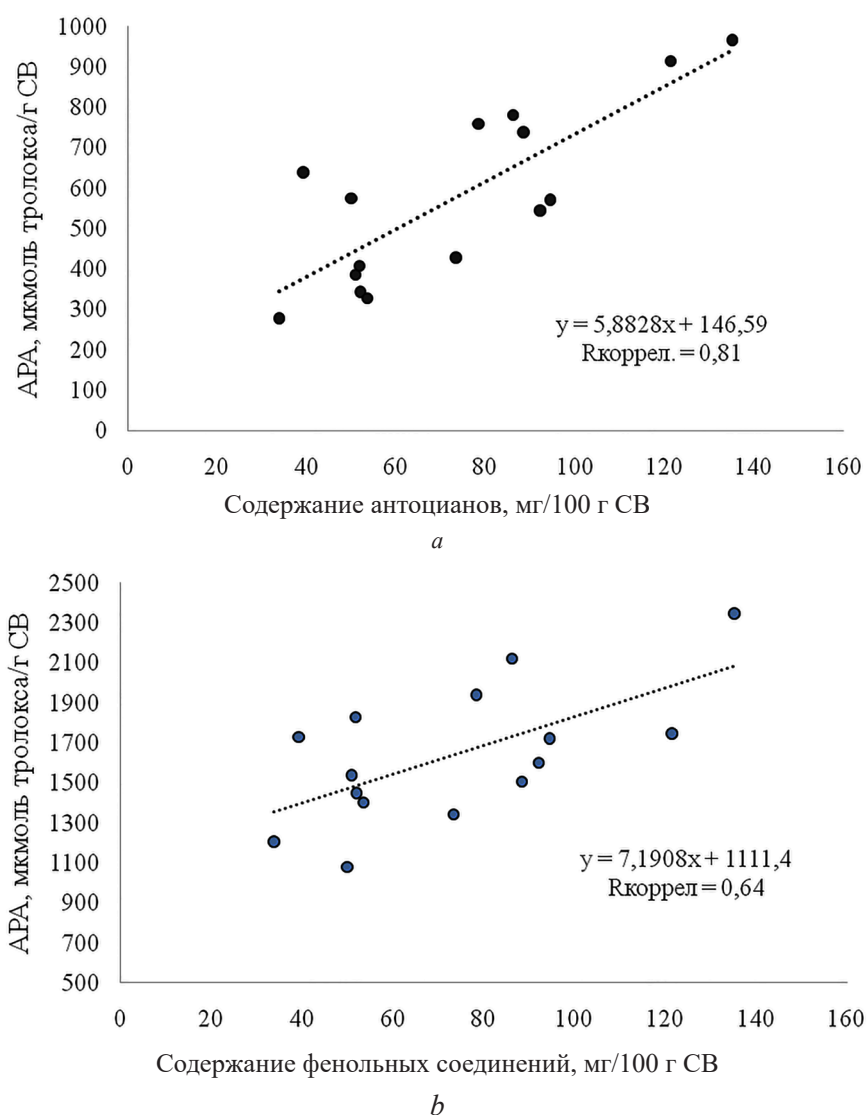


Рис. 4. Корреляционная связь между АРА разных сортов *Vaccinium corymbosum* L. и содержанием антоциановых пигментов (а) и фенольных соединений (b)

Fig. 4. Correlation between antiradical activity of different varieties of *Vaccinium corymbosum* L. and the content of anthocyanin pigments (a) and phenolic compounds (b)

Т а б л и ц а 1. АРА и суммарное содержание фенольных соединений в листьях растений *Vaccinium corymbosum* L. (in vivo)

T a b l e 1. ARA and the total content of phenolic compounds in leaves of *Vaccinium corymbosum* L. (in vivo)

С о р т	АРА, мкмоль тролокса/г СВ		Суммарное содержание фенольных соединений, мг/г СВ
	1 мин эксперимента	6 мин эксперимента	
Bluecrop	355,6	363,1	79,5 ± 2,63
Bluegold	331,2	343,3	78,3 ± 3,14
Bluetta	221,4	230,5	58,3 ± 2,52
Denise Blue	156,2	170,4	46,3 ± 1,53
Duke	455,6	463,1	101,1 ± 4,79
Earlyblue	589,5	597,3	146,4 ± 7,20
Northblue	302,7	317,5	68,6 ± 1,97

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2 относительная погрешность не превышала 5 %.

Определено также количественное содержание БАВ в листьях растений голубики высокорослой, полученной методом *in vitro* (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. АРА и суммарное содержание фенольных соединений в листьях растений *Vaccinium corymbosum* L. (*in vitro*)

T a b l e 2. ARA and the total content of phenolic compounds in leaves of *Vaccinium corymbosum* L. (*in vitro*)

Сорт	АРА, мкмоль тролокса/г СВ		Суммарное содержание фенольных соединений, мг/г СВ
	1 мин эксперимента	6 мин эксперимента	
Bluecrop	173,4	206,7	49,5 ± 0,84
Bluegold	223,0	245,9	56,3 ± 1,59
Bluetta	151,6	167,6	36,4 ± 0,87
Denise Blue	213,7	221,5	54,3 ± 1,73
Duke	266,5	282,1	62,7 ± 1,38
Earlyblue	206,1	225,3	51,4 ± 1,84
Northblue	165,4	185,5	34,9 ± 1,40

При построении корреляционных графиков коэффициенты корреляции содержания фенольных соединений и уровень АРА через 1 и 6 мин проведения эксперимента составили 0,90 и 0,93 соответственно ($T_{\text{крит. Стьюдента}} > 6$; $p < 0,05$), что свидетельствует о тесной взаимосвязи между данными показателями [14].

Результаты эксперимента показали, что содержание фенольных соединений в листьях растений голубики высокорослой, полученных методом культуры *in vitro*, находится в пределах от $34,6 \pm 1,64$ до $62,7 \pm 1,38$ мг/г СВ в пересчете на галловую кислоту, что ниже количественных показателей у растений в культуре *in vivo* (на 24–60 %). Наибольшим количеством фенольных соединений характеризовались сорта Duke и Bluegold.

В листьях микроклонально размноженных растений голубики сорта Earlyblue наблюдалось снижение содержания фенольных соединений, однако у сорта Bluegold, наоборот, содержание фенольных соединений возросло. Изменение уровня биосинтеза полифенолов в *in vivo* и *in vitro* растениях может быть связано с перераспределением исходных продуктов их синтеза для создания резерва, обеспечивающего жизнедеятельность растения, а большая устойчивость к стресс-факторам *in vitro* растений – оздоровлением при подготовке посадочного материала, так как фенолы синтезируются в ответ на патогенную атаку и окислительный стресс [15–17].

Известно, что биосинтетические изменения напрямую или опосредованно связаны с ключевым этапом реализации наследственной информации – биосинтезом белков. Их гетерогенность и специфичность определяют ход метаболизма и онтогенетическое развитие организма на каждом из этапов жизненного цикла и зависят от условий внешней среды (стрессы разной природы, обеспеченность элементами питания, водный режим, регуляторные воздействия и т. п.). При использовании комбинации протеомных методов исследования с метаболомными может быть дана детальная характеристика биохимического статуса целого организма или отдельной ткани [18, 19]. Подобных исследований на настоящий момент проведено немного, единичные из них касаются культуры клеток и тканей *in vitro* сортов голубики высокорослой.

Для двух сортов голубики, характеризующихся высоким накоплением фенольных соединений как в системе *in vivo*, так и в системе *in vitro*, проведен скрининг протеома. Первичный протеомный анализ общего пула белков, выделенных из листовой ткани растений сортов Duke и Earlyblue, позволил выявить индивидуальные белки, претендующие на роль маркеров функционального состояния растений, а также сортоспецифичные белки. При анализе полученных протеомных карт обнаружены полипептиды с молекулярной массой от 224,7 до 17,2 кДа.

Белки с одинаковой молекулярной массой у образцов *in vivo* и *in vitro* у разных сортов значительно различались по интенсивности экспрессии. Так, в листовой ткани растений голубики сорта Duke *in vivo* было выявлено два полипептида, не экспрессирующихся у сорта Earlyblue (молекулярная масса 37,11 и 63,69 кДа), у которого, в свою очередь, детектируются белки с моле-

кулярной масой 53,67; 47,05 и 43,48 кДа, отсутствующие на электрофореграмме сорта Duke. Выявленные белки могут претендовать на роль маркеров сортоспецифичности голубики указанных сортов.

В ходе протеомных исследований определены также белки, характерные только для *in vivo* растений *Vaccinium corymbosum* L. Это белки с молекулярной массой 61,47; 54,24 и 45,54 кДа, претендующие на роль белков – маркеров функционального состояния растений голубики.

Полученные данные, наряду с молекулярно-генетическими паспортами, можно использовать при определении функционального состояния, сортосоответствия и степени оздоровления представителя рода *Vaccinaceae* – голубики высокорослой.

Заключение. В результате проведенных исследований определено суммарное содержание фенольных соединений и антоцианов в плодах и листьях различных сортов *Vaccinium corymbosum* L. Максимальное их содержание отмечено у сортов Blueray, Bluerose, Caroline Blue, Herbert, Jersey, Nelson. В исследованных таксонах доля антоциановых пигментов в составе фенольных соединений составляла от 0,01 до 0,8 % в зеленых плодах и от 22 до 52 % в зрелых. Сорта Earlyblue, Duke, Bluescop, Bluegold характеризовались наибольшим количеством фенольных соединений в листьях. Определено наличие тесной положительной корреляционной связи между уровнем АРА и содержанием антоциановых пигментов в плодах и уровнем АРА и содержанием фенольных соединений в плодах и листьях, что может быть использовано для оценки биологической активности плодов и листьев голубики и создания фитопрепаратов на их основе. Определены отличия в накоплении фенольных веществ у сортов голубики, посадочный материал которых производился методами *in vivo* и *in vitro*.

Показано, что для определения сортосоответствия представителя рода *Vaccinaceae* наряду с генетическими паспортами можно использовать протеомный профиль растений голубики высокорослой.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Природные ресурсы и окружающая среда» (подпрограмма «Биоразнообразие, биоресурсы, экология», задание 06.02, 2021–2025 гг.).

Acknowledgements. This work was financially supported by the State Program of Scientific Research “Natural resources and the environment” (subprogram “Biodiversity, biological resources, ecology”, grant 06.02, 2021–2025).

Список использованных источников

- Holton, T. A. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis / T. A. Holton, E. C. Cornish // *Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7, N 7. – P. 1071–1083. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1071>
- Petroni, K. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs / K. Petroni, C. Tonelli // *Plant Sci*. – 2011. – Vol. 181, N 3. – P. 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009>
- Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention / S. Zafra-Stone [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res*. – 2007. – Vol. 51, N 6. – P. 675–683. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>
- He, J. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties / J. He, M. M. Giusti // *Ann. Rev. Food Sci. Technol*. – 2010. – Vol. 1, N 1. – P. 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
- Tsuda, T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies / T. Tsuda // *Mol. Nutr. Food Res*. – 2012. – Vol. 56, N 1. – P. 159–170. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>
- Wrolstada, R. E. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products / R. E. Wrolstada, R. W. Dursta, J. Leeb // *Trends Food Sci. Technol*. – 2005. – Vol. 16, N 9. – P. 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>
- Готтих, М. Б. Определение качественного и количественного состава антоцианиновых пигментов в составе биологически активных добавок с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) / М. Б. Готтих, В. Н. Ташлицкий // *РМЖ. Клин. офтальмология*. – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 106–108.
- Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juice / L. Jakobek [et al.] // *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. – 2007. – Vol. 103, N 2. – P. 58–64.
- Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) / M. Wang [et al.] // *J. Agricult. Food Chem*. – 2003. – Vol. 51, N 3. – P. 601–608. <https://doi.org/10.1021/jf020792b>
- Государственная Фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). 2007. Т. 2, с. 1207 (С. 330).
- Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re [et al.] // *Free Rad. Biol. Med*. – 1999. – Vol. 26, N 9/10. – P. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
- Jackson, B. P. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis, edited and translated from the second German edition by Norman Grainger Bisset, London; German edition edited by Max Wichtl, Marburg. With a foreword by J. David Phillipson, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1994. No. of pages: xvi + 566, price DM 298. ISBN 3-88763-025-4 [Book Reviews] / B. P. Jackson // *Flavour Fragrance J*. – 1995. – Vol. 10, N 5. – P. 337–339. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100512>

13. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
14. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск : Вышэйш. шк., 1964. – 328 с.
15. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured “Pixy” plum grown under different environments / K. E. Brainerd [et al.] // *HortScience*. – 1981. – Vol. 16, N 2. – P. 173–175.
16. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three chinese medicinal plants / H. Jang [et al.] // *Food Chem.* – 2007. – Vol. 103, N 3. – P. 749–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.026>
17. Душенков, В. Новая стратегия поиска природных биологически активных веществ / В. Душенков, И. Раскин // *Физиология растений*. – 2008. – Т. 55, № 4. – С. 624–628.
18. Vascular proteomics: linking proteomic and metabolomic changes / M. Mayr [et al.] // *Proteomics*. – 2004. – Vol. 4, N 12. – P. 3751–3761. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400947>
19. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage / T. L. Palama [et al.] // *BMC Plant Biol.* – 2010. – Vol. 10, N 1. – P. 82–101. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-82>

References

1. Holton T. A., Cornish E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, vol. 7, no. 7, pp. 1071–1083. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1071>
2. Petroni K., Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science*, 2011, vol. 181, no. 3, pp. 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.05.009>
3. Zafra-Stone S., Yasmin T., Bagchi M., Chatterjee A., Vinson J. A., Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2007, vol. 51, no. 6, pp. 675–683. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700002>
4. He J., Giusti M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2010, vol. 1, no. 1, pp. 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
5. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2012, vol. 56, no. 1, pp. 159–170. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>
6. Wrolstada R. E., Dursta R. W., Leeb J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 2005, vol. 16, no. 9, pp. 423–428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>
7. Gottikh M. B., Tashlitskii V. N. Determination of the qualitative and quantitative composition of anthocyanin pigments in biologically active additives using high performance liquid chromatography (HPLC). *RMZh. Klinicheskaya oftal'mologiya* [RMJ. Clinical ophthalmology], 2007, vol. 8, no. 3, pp. 106–108 (in Russian).
8. Jakobek L., Šeruga M., Medvidović-Kosanović M. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juice. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 2007, vol. 103, no. 2, pp. 58–64.
9. Wang M., Simon J. E., Aviles I. F., He K., Zheng Q.-Y., Tadmor Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, no. 3, pp. 601–608. <https://doi.org/10.1021/jf020792b>
10. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus (SF RB II), 2007, vol. 2, p. 1207 (P. 330).
11. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 26, no. 9/10, pp. 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)
12. Jackson B. P. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis, edited and translated from the second German edition by Norman Grainger Bisset, London; German edition edited by Max Wichtl, Marburg. With a foreword by J. David Phillipson, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1994. No. of pages: xvi + 566, price DM 298. ISBN 3-88763-025-4 [Book Reviews]. *Flavour and Fragrance Journal*, 1995, vol. 10, no. 5, pp. 337–339. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100512>
13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
14. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1964. 328 p. (in Russian).
15. Brainerd K. E., Fuchigami L.H., Kwiatkowski S., Clark C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured “Pixy” plum grown under different environments. *HortScience*, 1981, vol. 16, no. 2, pp. 173–175.
16. Jang H.-D., Chang K.-S., Huang Y.-S., Hsu C.-L., Lee S.-H., Su M.-S. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three chinese medicinal plants. *Food Chemistry*, 2007, vol. 103, no. 3, pp. 749–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.026>
17. Dushenkov V., Raskin I. A new search strategy for natural biologically active substances. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology], 2008, vol. 55, no. 4, pp. 624–628 (in Russian).
18. Mayr M., Mayr U., Chung Y.-L., Yin X., Griffiths J. R., Xu Q. Vascular proteomics: linking proteomic and metabolomic changes. *Proteomics*, 2004, vol. 4, no. 12, pp. 3751–3761. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400947>
19. Palama T. L., Menard P., Fock I., Choi Y. H., Bourdon E., Govinden-Soulange J., Bahut M., Payet B., Verpoorte R., Kodja H. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 82–101. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-82>

Информация об авторах

Чижик Ольга Владимировна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Деева Алла Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alladzeeva@gmail.com

Решетников Владимир Николаевич – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Olga V. Chizhik – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Alla M. Deeva – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alladzeeva@gmail.com

Vladimir N. Reshetnikov – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК [635.9.044:582.581]:581.1.043

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-16-23>

Поступила в редакцию 25.08.2021

Received 25.08.2021

Н. В. Гетко¹, Н. А. Бурчик¹, М. И. Баркун², В. В. Титок¹

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Центр светодиодных и оптоволоконных технологий НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА МОРФОГЕНЕЗ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ В ОРАНЖЕРЕЕ ЭПИФИТНОЙ ОРХИДЕИ *CATTLEYA LABIATA* LINDL.

Аннотация. В работе проведена оценка влияния трех видов LED-ламп с различным спектральным составом излучения и потоком фотонов фотосинтеза – PPG T8I Agro (37), Navigator DSP-FITO (47.5) и ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’ (100) – на морфогенез культивируемой в оранжерее орхидеи *Cattleya labiata* Lindl. Степень влияния спектрального состава света на морфогенез растений *C. labiata* оценена с помощью таких параметров, как толщина годовых листьев, процент сухого вещества и прирост биомассы на единицу поверхности листа (мкг/см²) за период 140 дней. Спектральные характеристики LED-лампы ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’ с белым свечением, интенсивностью PPF 100 рассматриваются в качестве наиболее благоприятных для успешного культивирования орхидеи *Cattleya labiata* в условиях оранжерей. При сочетании в составе спектра красного и зеленого спектров с величиной их соотношения, равной 1,3, и красного и синего спектров с величиной их соотношения, равной 3,34, наблюдается более высокий уровень накопления сухой массы на единицу поверхности листа при сохранении характерных для данного вида орхидей морфоструктурных параметров.

Ключевые слова: эпифиты, орхидеи, *Cattleya labiata*, оранжерейная культура, LED-лампы, спектры излучения, толщина листа, биомасса

Для цитирования: Влияние спектрального состава света на морфогенез культивируемой в оранжерее эпифитной орхидеи *Cattleya labiata* Lindl. / Н. В. Гетко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 16–23. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-16-23>

Nelly V. Hetko¹, Natalia A. Burchik¹, Michael I. Barkun², Vladimir V. Titok¹

¹Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Center for LED and Fiber Optic Technologies of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF THE SPECTRAL COMPOSITION OF LIGHT ON THE MORPHOGENESIS OF THE EPIPHYTIC ORCHID *CATTLEYA LABIATA* LINDL. CULTIVATED IN THE GREENHOUSE

Abstract. This work evaluates the test results of 3 types of LED lamps with different spectral composition of radiation and photon flux of photosynthesis (PPF, $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$): PPG T8I Agro (37), Navigator DSP-FITO (47.5) and DDP06-3×8-004 UHL 4 ‘Home Farm’ (100), in the greenhouse culture of the orchid *Cattleya labiata* Lindl. The parameters of the thickness of annual leaves, the percentage of dry matter and the increase in biomass per unit of leaf surface ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) formed over a period of 140 days were used as indicators to assess the degree of influence of the spectral composition of light on the morphogenesis of *C. labiata* plants. The spectral characteristics of the LED lamp DDP06-3×8-004 UHL 4 ‘Home Farm’ with a white glow, intensity PPF 100 are considered as the most favorable for the successful greenhouse cultivation of the orchid *Cattleya labiata* Lindl. The combination in its spectrum of red and green spectra with their ratio equal to 1.3, and when the ratio of red and blue spectra equal to 3.34, a higher level of dry matter accumulation is observed per unit of leaf surface area white maintaining parameter of the leaf structure characteristic of a given plant species.

Keywords: epiphytes, orchids, *Cattleya labiata*, greenhouse culture, LED lamps, emission spectra, leaf thickness, biomass

For citation: Hetko N. V., Burchik N. A., Barkun M. I., Titok V. V. Influence of the spectral composition of light on the morphogenesis of the epiphytic orchid *Cattleya labiata* Lindl. cultivated in the greenhouse. *Vesti Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 16–23 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-16-23>

Введение. Орхидеи (*Orchidaceae* Juss.) – это, пожалуй, одна из первых групп растений мировой тропической и субтропической эпифитной флоры, для которой использование искусственных источников света, в том числе и светодиодных излучателей, стало наиболее распространенной практикой в репродукции высокодекоративных, исчезающих и охраняемых в природе видов

с целью сохранения их в условиях искусственного климата. Одновременно это послужило основой для развития такой высокодоходной отрасли хозяйственной деятельности, как производство цветочной продукции (в срезке и в субстратной культуре), получившее наибольшее распространение в странах Юго-Восточной Азии и Азиатско-Тихоокеанского региона. Основная роль в этом плане отводится представителям родов *Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Cattleya*, *Oncidium* и их многочисленным сортам и гибридам.

Но прежде следует понять, какая роль отводится свету при адаптации к нему эпифитов в местах их естественного обитания и при освоении ими новых экологических ниш.

Большинство исследователей делят эпифиты в соответствии с экологическими нишами, которые они занимают в кроне дерева-хозяина, и модель самой дробной классификации была предложена D. R. Johansson [1]. Согласно этой модели, существует корреляция между двумя группами экологических факторов и распределением эпифитных орхидей вдоль больших ветвей дерева-хозяина. В первую группу факторов входят относительная влажность воздуха, влажность кроны, наличие в ней слоя гумуса, во вторую – освещенность, температура воздуха, сила ветра.

D. H. Benzing [2] уточнил, что определяющим фактором при заселении полога дерева эпифитами является степень доступности влаги. На основании этого он разделил их на CS-эпифиты – постоянно снабжаемые влагой (continuous supplied) и PS-эпифиты – периодически обеспечиваемые влагой (pulse supplied). Как правило, PS-эпифиты – это миниатюрные светолюбивые (гелиофильные) орхидеи, которые занимают наружную часть кроны, где они находятся в экстремальных условиях из-за частого пересыхания и бедности субстрата. Орхидеи CS-эпифиты более пластичны и при определенных условиях могут распространяться вдоль стволов и ветвей, переходя из одной экологической ниши в другую, что связано с их способностью развивать как воздушные, так и субстратные корни. Этот тип эпифитов представлен большинством орхидей в разных растительных сообществах тропиков земного шара, и *Cattleya labiata* является одной из них.

При изучении P. J. Cribb и H. Pfennig процесса акклиматизации орхидеи с детерминированным ростом *Pleione aurita* к свету путем исследования ее морфогенеза и фотосинтеза получены данные, проливающие свет на физиологические реакции эпифитов в условиях высокодинамичной среды их обитания (на деревьях). Высказано предположение о возможном изменении толщины годовых листьев орхидных под влиянием спектрального состава света [3].

В условиях оранжерей к определяющим факторам успешного выращивания орхидей эпифитов следует отнести свет, и исследования на начальном этапе касались изучения влияния отдельных участков спектра на рост и развитие растений. Было показано, что продуктивность и эффективность оранжерейной культуры высокодекоративных орхидей при использовании современных технологий искусственного освещения напрямую зависят от качества света. Например, было установлено [4], что скорость иницирования органогенеза *in vitro* у гибрида *Cattleya intermedia* × *C. aurantiaca* зависит от длины волны применяемого монохроматического света. Красный и синий свет были эффективны в запуске органогенеза. Коэффициенты размножения у растений при освещении красным, синим, белым светом и в темноте составили 1,7; 10,6; 8,3 и 6,2 соответственно. Общее содержание хлорофилла и каротиноидов было самым высоким в культурах, освещенных белым светом, постепенно снижаясь при переходе спектра освещения от синего к красному и дальнему красному свету. Это согласуется с результатами, полученными L. Mengxi с соавт. [5] в опытах по размножению сорта орхидеи *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. При синем свете повышалась эффективность микроразмножения и иницировался ризогенез, удлинялись воздушные корни, а полученные в результате растения соответствовали исходным образцам.

Следует отметить, что потребность в интенсивности освещения для *Cattleya labiata* в местах ее естественного ареала находится в пределах 25–40 тыс. лк [6]. В условиях оранжерей умеренной климатической зоны тропические крупноцветковые орхидеи секции *Cattleya* Lindley, которые сохраняются в коллекциях ботанических садов России и Украины, выращиваются при температуре 20–24 °С, влажности воздуха 65–85 % на белом свету при освещенности 7–10 тыс. лк [6, 7]. В Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета для содержания коллекции и размножения красивоцветущих тропических орхидей используют люминесцентные

лампы типа Philips TLD 18W-640 со спектром, охватывающим практически весь диапазон фотосинтетической активной радиации, что обеспечивает продолжительность светового дня в зимний период до 10–16 ч и освещенность до 3 клк [8].

Цель данного исследования – изучение влияния спектрального состава света на морфогенез *Cattleya labiata*, выращиваемой в условиях оранжерей Центрального ботанического сада НАН Беларуси с использованием ряда светодиодных источников излучения для дополнительного освещения.

Объекты и методы исследования. Эксперименты проводили в Центральном ботаническом саду (ЦБС) НАН Беларуси, г. Минск (53° 53' с. ш., 27° 34' в. д.). Дневная температура в оранжерее составляла 22–30 °С, ночная – 16–18 °С, относительная влажность воздуха – 70 %, освещенность – 7–10 тыс. лк.

Объектом исследования являлась каттлея губастая (*Cattleya labiata* Lindl.) – симподиальная однолистная эпифитная орхидея с широким ареалом, естественно произрастающая в горных районах на северо-востоке Бразилии, в штатах Пернамбуко, Параиба и Сеара. Вид впервые обнаружен Уильямом Суэйнсоном в 1817 г. в провинции Пернамбуко. Эндемик Бразилии. Поселяется на стволах деревьев, а также на голых или покрытых лишайниками скалах, как в тени, так и на открытых участках [6]. Относится к семейству *Orchidaceae* Juss., подсемейству *Epidendroideae*, трибе *Epidendreae*, подтрибе *Laeliinae*, роду и подроду *Cattleya*, секции *Cattleya* Lindley. Туберидии растения высотой 12–30 см, булабовидные, немного сплюснутые, покрыты зеленоватыми тонкими чехлами, однолистные. Лист длинный, продолговатый, широкий, кожистый, закругленный на конце, 15–25 см в длину и 6 см в ширину. Цветенос короткий, прямостоячий, несет 2–5 цветков, собранных в соцветие. Цветы появляются из двойного чехла, плотной текстуры, ароматные, диаметром 12–18 см. Лепестки светло-розовые, к краям более яркие. Губа крупная, насыщенного пурпурного цвета, переходящего к краю в темно-сиреневый цвет (рис. 1). Период цветения – ноябрь, декабрь.

Экспериментальные растения выращивали в субстрате из коры, используя прозрачные пластмассовые контейнеры диаметром 6 см и стеллажные световые шкафы, оснащенные тремя видами светодиодных светильников LED: 1 – PPG T8I Agro; 2 – Navigator DSP-FITO с соотношением красного (650 нм) и синего (450 нм) света 5:1 и 1:1 соответственно; 3 – мультиспектральный светодиодный источник ДДП06-3×8-004 УХЛ4 'Home Farm'. Длина светового периода в варианте с дополнительным облучением – 12 ч; контроль – естественное освещение без дополнительного облучения. В каждом варианте опыта было по 10 растений. Период проведения опыта – 140 дней (с марта по сентябрь).

Светодиодный светильник ДДП06-3×8-004 УХЛ4 'Home Farm' является отечественной разработкой и производится Республиканским научно-производственным унитарным предприятием «Центр светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси». Основные характеристики светильника: поток излучения – 10 Вт, поток фотонов – 50 мкмоль/с. Источник излучения имеет широкий диапазон длин волн, включая фотосинтетически активную радиацию. Наличие в излучении квантов света различных длин волн позволяет изучать все фотобиологические процессы, присущие растительным организмам.



Рис. 1. Цветущая орхидея каттлея губастая (*Cattleya labiata* Lindl.) в коллекционном фонде ЦБС НАН Беларуси (фото Н. А. Бурчик)

Fig. 1. Flowering orchid *Cattleya labiata* Lindl. in the collection fund of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (photo N. Burchik)

В качестве источника света использовали высокоэффективные энергосберегающие светодиоды в сочетании со специальной технологией получения оптимального спектра на основе люминофорных композиций отечественной разработки.

Облученность растений в эксперименте определяли на уровне верхушки растений с помощью спектрометра PAR PG200N.

Листья, образовавшиеся за время эксперимента, были отобраны для приготовления поперечных срезов, фотографии которых получены при 10- и 40-кратном увеличении на микроскопе Olympus VX46. Анализ морфометрических параметров осуществляли с помощью программного обеспечения ImageJ, для статистической обработки полученных данных использовали компьютерную программу Statistica.

Результаты и их обсуждение. Степень влияния спектрального состава света на морфогенез растений *Cattleya labiata* оценивали по таким показателям, как толщина годовых листьев, процент сухого вещества и прирост его биомассы на единицу поверхности листа (мкг/см²) за период 140 дней (см. таблицу).

Влияние спектрального состава света на морфогенез листьев эпифитной орхидеи *Cattleya labiata* Lindl. в оранжерейной культуре

Influence of the spectral composition of light on the morphogenesis of leaves of the epiphytic orchid *Cattleya labiata* Lindl. in the greenhouse culture

Исследуемый параметр	Светодиодный источник LED			Естественное освещение (контроль)
	PPG T8I Agro (вариант 1)	Navigator DSP-FITO (вариант 2)	ДДП06-3×8-004 УХЛ4 Home Farm (вариант 3)	
<i>Спектральные характеристики света</i>				
PPFD, мкмоль/м ² /с	30,26	38,15	88,00	22,39
PFD, мкмоль/м ² /с	37,2	47,46	99,36	31,46
PFD-B: мкмоль/м ² /с % от PFD	6,38 17,15	6,71 14,14	13,00 13,08	5,24 16,66
PFD-G: мкмоль/м ² /с % от PFD	3,96 10,64	4,80 10,10	31,60 31,80	8,31 26,41
PFD-R: мкмоль/м ² /с, % от PFD	19,93 53,6	26,64 56,13	43,34 43,62	8,84 28,13
PFD-FR: мкмоль/м ² /с % от PFD	6,58 17,70	8,98 18,92	11,04 11,11	8,42 28,76
PFD-UV: мкмоль/м ² /с % от PFD	0,40 1,07	0,33 0,70	0,38 0,38	0,65 2,07
<i>Соотношение частей спектров</i>				
B/G	1,61	1,40	0,41	0,63
R/G	5,00	5,05	1,31	1,37
FR/G	1,66	1,87	0,35	1,01
R/B	3,12	3,97	3,34	1,69
R/FR	3,03	2,97	3,93	1,05
<i>Морфометрические параметры листа</i>				
Толщина, мкм	842,72 ± 37,76	1387,81 ± 149,05	1280,37 ± 90,18	1314,60 ± 73,7
% сухого вещества	9,13 ± 2,02	10,76 ± 0,46	11,64 ± 0,43	8,46 ± 1,04
Сухая масса, мкг/см ²	11,96 ± 5,96	19,62 ± 3,55	17,11 ± 1,84	14,10 ± 3,90

П р и м е ч а н и е. PPFD (photosynthetic photon flux density – фотосинтетическая облученность) – количество фотонов, падающее на 1 м²/с в диапазоне длин волн 400–700 нм; PFD (photon flux density – фотонная облученность) – количество фотонов, падающее на 1 м²/с в диапазоне длин волн 380–780 нм; PFD-R, PFD-G, PFD-B, PFD-FR, PFD-UV – фотонная облученность в красной (600–700 нм), зеленой (500–600 нм), синей (400–500 нм), дальней красной (700–780 нм) и ультрафиолетовой (380–400 нм) областях спектра соответственно.

Как следует из приведенных данных, все исследуемые параметры листьев, сформированных за период испытаний с облучением растений *Cattleya labiata* лампами LED с различными спектральными характеристиками света (варианты 1–3), показали не только существенные отклонения от контроля, но и различия при межвариантном сравнении, подтверждая высокую чувствительность фотосинтезирующих органов орхидеи *Cattleya labiata* к качеству света в условиях оранжерейной культуры.

При сравнении полных спектров излучения приведенных выше светодиодных ламп LED обнаружена существенная разница между ними в интенсивности освещения в диапазоне PFD 37–99 мкмоль/м²/с, а также между долями красного, синего, зеленого и дальнего красного спектров соответственно по сравнению с контролем (без облучения).

Как следует из приведенных данных, в спектре LED-ламп с низкой интенсивностью света PPG T8I Agro (PPF 37) и Navigator DSP-FITO (PPF 47.5) преобладает доля красного спектра (PFD-R), которая составляет 37 мкмоль/м²/с (53,6 %) и 47,5 мкмоль/м²/с (56,1 %) соответственно. В первом варианте опыта за период наблюдений сформировались самые тонкие листья, но содержание в них сухого вещества было сравнимо или незначительно превосходило аналогичный показатель в контроле. Согласно данным, приведенным в работе Т. Cybularz-Urban с соавт. [4], красный монохроматический свет вызывает разрушение клеток мезофилла листа и уменьшение листовой пластинки у черенков *Cattleya hybrid*, что частично может быть снято путем добавления синего света. Доля синего спектра в варианте с облучением лампой PPG T8I Agro (17,2 %) превосходит другие варианты, однако толщина листа и показатели продуктивности биомассы на единицу поверхности листа (мкг/см²) остаются ниже по сравнению с контролем: 842,7 против 1314,6 и 11,6 против 14,1 соответственно. Это может быть обусловлено тем, что интенсивности излучения данной лампы (PPF 37), необходимой для эффективного осуществления фотосинтеза у растений орхидеи *Cattleya labiate*, недостаточно.

В варианте с облучением лампой Navigator DSP-FITO исследуемые параметры листа (толщина пластинки и накопление биомассы) у растений данного вида характеризовались значениями, превышающими аналогичные показатели в контроле и других вариантах опыта (1387,8 мкм и 19,4 мкг/см²), что может быть обусловлено величиной соотношения спектров красного и синего (в первом варианте – 3:1, во втором – 4:1). Доля синего света в этом варианте опыта была сравнительно ниже (14,1 %), однако, в отличие от других вариантов опыта и контроля, при сравнительно низкой интенсивности облучения (PPF47,5) у растений *Cattleya labiata* формировались самые толстые листья и отмечалась более высокая биомасса сухого вещества в расчете на единицу поверхности листа (19,4 мкг/см²). Очевидно, что спектральный состав света LED-лампы Navigator DSP-FITO является для *Cattleya labiata* более эффективным в отношении увеличения биомассы на единицу поверхности листа и его толщины. Но для растений природной флоры, культивируемых в оранжереях, главным условием является сохранение их видовых признаков. А поскольку толщина листа является одним из них, то для культивирования орхидеи *Cattleya labiata* световые условия с использованием LED-ламп Navigator DSP-FITO и PPG T8I Agro неприемлемы, так как в этом случае могут быть сформированы растения с морфологически измененными параметрами видового признака.

В условиях естественного освещения в оранжереях, независимо от климатической зоны, все видовые морфологические признаки листа у растений сохраняются, и в качестве контрольного варианта в данных исследованиях нами выбраны условия естественного освещения без использования дополнительного.

При культивировании растений *Cattleya labiata* с использованием мультиспектральной LED-лампы ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’ с белым свечением и с вдвое более высокой интенсивностью облучения (PPF 100) по сравнению с приведенными выше LED-лампами у растений были сформированы листья, сравнимые с контрольными по толщине (рис. 2), но с большей долей сухой массы (%) – 11,62 против 8,46, а в расчете на единицу листовой поверхности (мкг/см²) – 17,11 против 14,1 (см. таблицу), что свидетельствует о более высокой эффективности использования в фотосинтезе растениями *Cattleya labiata* энергии светового потока LED-лампы ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’, у которой почти треть (32 %) излучения при данной плотности приходится на зеленую область спектра (PFD-G = 32 мкмоль/м²/с). Излучение данной лампы с соотношением красной и зеленой частей ее спектра, равным 1,3, и оптимальным для LED-ламп соотношением красного и синего спектров на уровне 3,4 обуславливает более высокий уровень накопления сухой массы на единицу поверхности листа и сохранение характерных для вида его морфоструктурных параметров.

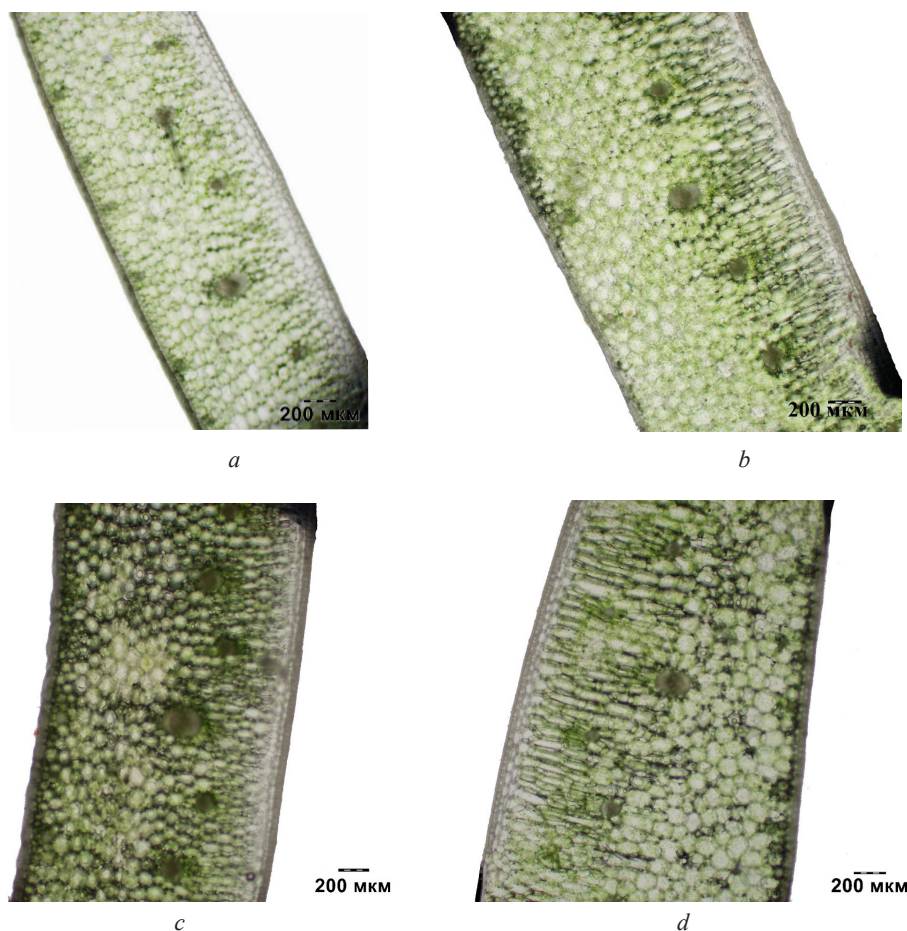


Рис. 2. Поперечные срезы годовых листьев *Cattleya labiata* Lindl., сформированных за период 140 дней выращивания в оранжерее с использованием LED-ламп с разными интенсивностью и спектрами излучения: *a* – PPG T8I Agro (PPF 37); *b* – Navigator DSP-FITO (PPF47.5); *c* – ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’ (PPF 100); *d* – контроль

Fig. 2. Cross sections of annual leaves of *Cattleya labiata* Lindl., formed over a period of 140 days of cultivation in a greenhouse in versions using LED lamps of various intensities and emission spectra: *a* – PPG T8I Agro (PPF 37); *b* – Navigator DSP-FITO (PPF47.5); *c* – ДДП06-3×8-004 UHL 4 ‘Home Farm’ (PPF 100); *d* – the control

В настоящее время активно изучается вопрос о роли и эффективности зеленого спектра в регуляции метаболизма у растений. R. M. Klein с соавт. [9] в исследованиях, касающихся изучения влияния зеленого света на биологические системы, показали, что зеленый свет в диапазоне длин волн 510–585 нм подавляет рост широкого ряда организмов, включая водоросли, грибы, высшие растения и даже культуры клеток растений.

Однако существует и другая точка зрения. Известно, что красный и синий свет стимулируют фотосинтетический метаболизм у автотрофов. Но зеленый свет также оказывает дискретное влияние на метаболизм растений, и механизмы, которые определяют это качество света, в настоящее время выясняются. Так, К. М. Folta, S. A. Maruchnich [10], проанализировав данные фотобиологических исследований за последние 50 лет, касающиеся роли зеленого света в регуляции вегетативного развития растений, фотопериодического цветения, открытия устьиц, модуляции роста стебля, экспрессии генов хлоропластов и роста растений, пришли к выводу, что регуляторные механизмы действия зеленого света на растения хорошо сочетаются с аналогичными механизмами красного и синего света.

Приведенные в работе [8] результаты показывают, что сочетание белого света с зеленым или красным стимулировало удлинение стебля у орхидеи *Cymbidium hybridum* в культуре *in vitro* на 70 и 13 % соответственно по сравнению с его удлинением при облучении белым светом в контрольной группе. Длина корней зародышей увеличивалась соответственно на 85 и 193 % относительно контроля при добавлении зеленого и красного света. Общая площадь листьев и сырая

масса проростков также увеличивались в длинноволновой области спектра, в то время как сочетание белого и синего света приводило к противоположному результату.

Учеными NASA проведен эксперимент по подбору подходящих для роста растений осветительных систем в космических аппаратах. Так, было доказано улучшение роста листового салата при его выращивании с использованием красного и синего спектров ламп LED и добавлении 24 % зеленого света (от 500 до 600 нм) при постоянной плотности фотонов (PPFD) [11]. Листья растения имели большую поверхность и большую сырую и сухую массу, чем растения, выращенные исключительно при красном или синем свете. Результаты наших исследований полностью согласуются с приведенными выше и в отношении эпифитной орхидеи *Cattleya labiata*, культивируемой в оранжерее.

Кроме того, рядом авторов [12] получены результаты, которые указывают на то, что зеленый свет высокоинтенсивных LED-ламп (PPF 200), и прежде всего в их коротковолновом диапазоне 510–530 нм, проникает в листья наиболее эффективно и увеличивает фиксацию листом CO₂ при фотосинтезе. Вместе с тем генетические и физиологические исследования показали, что некоторые реакции на зеленый свет вряд ли можно отнести к известному в настоящее время набору световых рецепторов [13]. Понимание того, что отличает морфологические и физиологические изменения, индуцируемые зеленым светом, от изменений, вызванных иными известными фотосенсорными системами, поможет разобраться в механизме воздействия зеленого света, углубить и расширить знания о том, как различные области спектра (независимо или совместно) регулируют морфогенез растений.

Заключение. Таким образом, полученные результаты подтверждают высокую чувствительность фотосинтезирующих органов орхидеи *Cattleya labiata* к качеству света в условиях оранжерейной культуры при использовании трех видов LED-ламп с различным спектральным составом излучения и потоком фотонов фотосинтеза (PPF, мкмоль/м²/с): PPG T8I Agro (37), Navigator DSP-FITO (47.5), ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’ (100). Степень влияния спектрального состава света на морфогенез растений *Cattleya labiata* оценивали по таким показателям, как толщина годовых листьев, процент сухого вещества и прирост его биомассы на единицу поверхности листа (мкг/см²) за период 140 дней. Показано, что спектральные характеристики LED-ламп ДДП06-3×8-004 УХЛ 4 ‘Home Farm’ с белым свечением, интенсивностью PPF 100 являются наиболее благоприятными для успешного культивирования орхидеи *Cattleya labiata* Lindl. в условиях оранжерей. Сочетание в составе ее спектра красного и зеленого спектров с соотношением красного и зеленого, равным 1,3, и соотношением красного и синего спектров, равным 3,34, наблюдается более высокий уровень накопления сухой массы на единицу поверхности листа при сохранении характерных для данного вида морфоструктурных параметров.

Список использованных источников

1. Johansson, D. R. A method to register the distribution of epiphytes on the host tree / D. R. Johansson // Am. Orch. Soc. Bull. – 1978. – Vol. 47, N 10. – P. 901–904.
2. Benzing, D. H. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity / D. H. Benzing // Ann. Missouri Bot. Garden. – 1987. – Vol. 74, N 2. – P. 183–204. <https://doi.org/10.2307/2399394>
3. Zhang, W. The study of a determinate growth orchid highlights the role of new leaf production in photosynthetic light acclimation / W. Zhang, W. Huang, S.-B. Zhang // Plant Ecol. – 2017. – Vol. 218, N 6. – P. 997–1008. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0747-5>
4. Cybularz-Urban, T. Effect of light wavelength on in vitro organogenesis of a *Cattleya hybrid* / T. Cybularz-Urban, E. Hanus-Fajerska, A. Swiderski // Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. – 2007. – Vol. 49, N 1. – P. 113–118.
5. Efficient of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration / L. Mengxi [et al.] // Cell Tiss. Organ Cult. – 2011. – Vol. 106. – P. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9887-1>
6. Коломейцева, Г. Л. Крупноцветковые орхидеи в коллекции Главного ботанического сада им. Н. В. Цицина РАН (*Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*) / Г. Л. Коломейцева. – М. : ГЕОС, 2014. – 296 с.
7. Черевченко, Т. М. Орхидеи в культуре / Т. М. Черевченко, Г. П. Кушнир. – Киев : Навук. думка, 1986. – 200 с.
8. The influence of light spectrum on morphogenesis of orchid germs *in vitro* / L. V. Khotskova [et al.] // IOP conference series: materials science and engineering. The VII International conference for young scientists “High Technology: Research and Applications”, 26–30 November 2018, Tomsk, Russian Federation. – S.l., 2019. – Vol. 510. – Art. 012032.
9. Klein, R. M. Effects of green light on biological systems / R. M. Klein // Rev. Cambridge Philos. Soc. – 1992. – Vol. 67, N 2. – P. 199–284. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1992.tb01019.x>

10. Folta, K. M. Green light. A signal to slow down or stop / K. M. Folta, S. A. Maruchnich // J. Exp. Botany. – 2007. – Vol. 58, N 12. – P. 3099–3111. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm130>
11. Green light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and blue-light-emitting diodes / H. H. Kim [et al.] // HortScience. – 2004. – Vol. 39, N 7. – P. 1617–1622. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.7.1617>
12. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Latuca sativa* / M. Johkan [et al.] // Environ. Exp. Botany. – 2012. – Vol. 75. – P. 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.010>
13. Wang, Y. Contribution of green light to plant growth and development / Y. Wang, K. M. Folta // Am. J. Bot. – 2013. – Vol. 100, N 1. – P. 70–78. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200354>

References

1. Johansson D. R. A method to register the distribution of epiphytes on the host tree. *American Orchid Society Bulletin*, 1978, vol. 47, no. 10, pp. 901–904.
2. Benzing D. H. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1987, vol. 74, no. 2, pp. 183–204. <https://doi.org/10.2307/2399394>
3. Zhang W., Huang W., Zhang S.-B. The study of a determinate growth orchid highlights the role of new leaf production in photosynthetic light acclimation. *Plant Ecology*, 2017, vol. 218, no. 6, pp. 997–1008. <https://doi.org/10.1007/s11258-017-0747-5>
4. Cybularz-Urban T., Hanus-Fajerska E., Swiderski A. Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya hybrid*. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 2007, vol. 49, no. 1, pp. 113–118.
5. Mengxi L., Zhigang X., Yang Y., Yijie F. Efficient of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, vol. 106, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9887-1>
6. Kolomeitseva G. L. Large-flowered orchids in the collection of the Main Botanical Garden. N. V. Tsitsina RAS (*Cattleya, Cymbidium, Dendrobium, Paphiopedilum, Phalaenopsis*). Moscow, GEOS Publ., 2014. 296 p. (in Russian).
7. Cherevchenko T. M., Kushnir G. P. *Orchids in culture*. Kiev, Naukova Dumka Publ., 1986. 200 p. (in Russian).
8. Khotskova L. V., Stepanyuk G. Ya., Yamburov M. S., Astafurova T. P., Turanov S. B. The influence of light spectrum on morphogenesis of orchid germs *in vitro*. *IOP conference series: materials science and engineering. The VII International conference for young scientists "High Technology: Research and Applications", November 26–30, 2018, Tomsk, Russian Federation. Vol. 510*. IOP Publishing Ltd, 2019, art. 012032.
9. Klein R. M. Effects of green light on biological systems. *Reviews of Cambridge Philosophical Society*, 1992, vol. 67, no. 2, pp. 199–284. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1992.tb01019.x>
10. Folta K. M., Maruchnich S. A. Green light. A signal to slow down or stop. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, no. 12, pp. 3099–3111. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm130>
11. Kim H. H., Gons C. D., Wheeler R. M., Sager J. S. Green light supplementation for enhanced lettuce growth under red- and blue-light-emitting diodes. *HortScience*, 2004, vol. 39, no. 7, pp. 1617–1622. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.7.1617>
12. Johkan M., Shoji K., Goto F., Hahida S., Yoshihara T. Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Latuca sativa*. *Environmental and Experimental Botany*, 2012, vol. 75, pp. 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.010>
13. Wang Y., Folta K. M. Contribution of green light to plant growth and development. *American Journal of Botany*, 2013, vol. 100, no. 1, pp. 70–78. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200354>

Информация об авторах

Гетко Нелли Владимировна – д-р биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: N.Hetko@cbg.org.by

Бурчик Наталья Анатольевна – соискатель. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: green-ice@tut.by

Баркун Михаил Иосифович – вед. специалист. Центр светодиодных и оптоволоконных технологий НАН Беларуси (Логойский тракт, 20, 220090, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: m.barkun@ledcenter.by

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, директор. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Information about the authors

Nelly V. Hetka – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Chief Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: N.Hetko@cbg.org.by

Natalia A. Burchik – Applicant. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (Surganov Str., 2v, 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: green-ice@tut.by

Mikhail I. Barkun – Leading specialist. Center for LED and fiber-optic technologies of the National Academy of Sciences of Belarus (20, Logoiskii tract, 220090, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: m.barkun@ledcenter.by

Vladimir V. Titok – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 634.739.3:736(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-24-32>

Поступила в редакцию 04.05.2021

Received 04.05.2021

Ж. А. Рупасова¹, А. П. Яковлев¹, И. В. Савосько¹, П. Н. Белый¹, В. И. Домаш²,
С. Г. Азизбекян³, И. И. Лиштван⁴, Л. В. Гончарова¹

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

³Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

⁴Институт природопользования НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТНОЙ РЕАКЦИИ АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА ПЛОДОВ ГОЛУБИКИ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) НА ПРИМЕНЕНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ УДОБРЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ВЫРАБОТАННОГО ТОРФЯНИКА НИЗИННОГО ТИПА

Аннотация. Исследовано влияние минеральных и органических удобрений – $N_{16}P_{16}K_{16}$, Нанопланта, Гидрогумата и Экосила на состояние антиоксидантного комплекса плодов раннеспелых (*Northcountry*, *Croaton*) и среднеспелых (*Bluecrop*, *Northland*) сортов голубики высокорослой на выработанном торфянике низинного типа в центральной агроклиматической зоне Беларуси. Показана существенная зависимость изменения уровня их антиоксидантной и ферментативной активности от вида удобрений и генотипа растений. У большинства сортов усиление минерального питания способствовало повышению уровня антиоксидантной активности до 28 %, наиболее значительному при использовании Нанопланта и Гидрогумата. Выявлен отчетливый антагонизм в изменении активности пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ), с одной стороны, и полифенолоксидазы (ПФО), с другой, по сравнению с контролем, проявившийся в синхронном ее увеличении у первой пары ферментов до 77 и 30 % у сорта *Northcountry*, 171 и 152 % у сорта *Croaton*, 137 и 182 % у сорта *Bluecrop* и до 122 % у сорта *Northland* (только для ПО), на фоне преимущественного снижения активности ПФО на 13–55 %.

В большинстве случаев испытываемые агроприемы обуславливали повышение общего уровня оксидантной активности плодов голубики на 30–310 %, особенно у сортов *Croaton* и *Bluecrop*, при наибольшей эффективности органических удобрений, особенно Гидрогумата, тогда как обработки Наноплантом оказывали на него ингибирующее действие у сортов *Northcountry* и *Northland* и стимулирующее у сортов *Croaton* и *Bluecrop*.

Ключевые слова: выработанный торфяник низинного типа, высокорослая голубика, сорта, плоды, минеральные и органические удобрения, антиоксидантная активность, окислительно-восстановительные ферменты, каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза

Для цитирования: Генотипические особенности ответной реакции антиоксидантного комплекса плодов голубики (*Vaccinium corymbosum* L.) на применение минеральных и органических удобрений в условиях выработанного торфяника низинного типа / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биял. наук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 24–32. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-24-32>

Zhanna A. Rupasova¹, Aleksandr P. Yakovlev¹, Irina V. Savosko¹, Pavel N. Bely¹, Valentina I. Domash²,
Sergey G. Azizbekyan³, Ivan I. Lishtvan⁴, Lyudmila V. Goncharova¹

¹Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

⁴Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

GENOTYPIC FEATURES THE RESPONSE OF THE ANTIOXIDANT COMPLEX OF BLUEBERRY FRUITS (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.) TO THE USE OF MINERAL AND ORGANIC FERTILIZERS ON LOWLAND PEATLAND

Abstract. The results of a comparative study of the influence of mineral and organic fertilizers – $N_{16}P_{16}K_{16}$, Nanoplant, Hydrohumate, and Ecosil – on the state of the antioxidant complex of early-ripening (*Northcountry*, *Croaton*) and mid-ripening (*Bluecrop*, *Northland*) varieties of tall blueberries in an experimental culture on a low-lying peat bog in the Central agro-climatic zone of Belarus are presented. A significant dependence of changes in the level of their antioxidant and enzymatic activity on the type of fertilizers and the genotype of plants is shown. In most varieties, the increase in mineral nutrition con-

tributed to an increase in the antioxidant activity level up to 28 %, the most significant when using Nanoplant and Hydrogumate. Revealed a distinct antagonism in changing the activity of peroxidase and catalase, on the one hand, and polyphenol oxidase, on the other: it increases synchronously in the first pair of enzymes to 77 and 30 % in varieties *Northcountry*, 171 and 152 % in the variety *Croaton*, 137 and 182 % in the variety *Bluecrop* and to 122 % of varieties for the *Northland*, against a preferential decrease in the activity of polyphenol oxidase in 13–55 %.

In most cases, the tested agricultural practices have contributed to raising the general level oxidase activity of blueberry fruit. Especially in *Croaton* and *Bluecrop* varieties, by 30–310 %, with the highest efficiency of organic fertilizers, especially Hydrogumate. Nanoplant treatments had an inhibitory effect on the general level oxidase activity in *Northcountry* and *Northland* varieties and a stimulating effect in *Croaton* and *Bluecrop* varieties.

Keywords: worked-out low peat bog, highbush blueberry, varieties, fruits, mineral and organic fertilizers, antioxidant activity, redox enzymes, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase

For citation: Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Savosko I. V., Bely P. N., Domash V. I., Azizbekyan S. G., Lishtvan I. I., Goncharova L. V. Genotypic features the response of the antioxidant complex of blueberry fruits (*Vaccinium corymbosum* L.) to the use of mineral and organic fertilizers on lowland peatland. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 24–32 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-24-32>

Введение. Общеизвестно, что фармакологическая коррекция окислительного стресса осуществляется с применением биологически активных соединений – антиоксидантов, прерывающих нарастающие процессы окисления с образованием малоактивных радикалов, легко выводящихся из организма. При этом существенную роль в защите растительных клеток от кислородных интермедиантов играют ферменты, способные обезвреживать супероксидные радикалы и перекисные соединения в клетках. В частности, пероксидаза (ПО), восстанавливая перекись водорода до воды, участвует в окислительно-восстановительных процессах фотосинтеза и дыхания, энергетического и азотного обмена, в образовании ауксинов и этилена, регуляции развития и органогенеза растительного организма [1]. Наряду с пероксидазой активную роль в фенольном метаболизме растений играет полифенолоксидаза (ПФО), катализирующая окисление различных фенольных соединений в семихиноны и хиноны с участием молекулярного кислорода [2]. Важнейшим компонентом антиокислительной системы растений является также каталаза (КАТ), которая катализирует дисмутацию H_2O_2 до H_2O и O_2 и способна в окисленном состоянии работать как ПО, ускоряя окисление спиртов или альдегидов [3]. Все обозначенные выше ферменты окислительно-восстановительного цикла имеют первостепенное значение в регуляции обменных процессов в растительном организме при воздействии широкого спектра абиотических факторов, приводящих к временному сдвигу тканевого баланса антиоксидантов и прооксидантов в сторону последних.

Распространено мнение, что одной из наиболее перспективных для использования в медицинской практике групп природных антиоксидантов являются растительные полифенолы, чрезвычайно активно накапливающиеся в ягодной продукции вересковых, в том числе голубики высокорослой [4]. В связи с оптимизацией режима минерального питания данной культуры на выработанном торфянике низинного типа была изучена ответная реакция антиоксидантного комплекса плодов голубики на применение не только традиционно используемого полного минерального удобрения, но и ряда высокоэффективных отечественных препаратов с ростстимулирующим действием, являющихся весьма сильными внешними агентами. Значительный научный и практический интерес при этом представляло выявление генотипических особенностей ответной реакции ряда промышленных сортов голубики разных сроков созревания на использование органических удобрений – Экосила, содержащего природный комплекс тритерпеновых кислот [5], и Гидрогумата, действующим веществом которого являются гуматы – водорастворимые соли гуминовых кислот, активизирующие включение макро- и микроэлементов в процессы синтеза биологически активных соединений [6], что представляется весьма актуальным в связи с принятым в ноябре 2018 г. в Республике Беларусь Законом «О производстве и обращении органической продукции», существенно ужесточающим требования к качеству экологически чистой растениеводческой продукции (при ее производстве запрещено использование любых химических средств, в том числе минеральных удобрений). Наряду с этими органическими удобрениями было осуществлено испытание белорусского микроудобрения Наноплант-8, включающего комплекс микроэлементов (Co, Mn, Cu, Fe, Zn, Cr, Mo, Se) [7].

Объекты и методы исследования. Исследования выполнены в 2017–2018 гг. в условиях опытной культуры в центральной агроклиматической зоне Беларуси (Березинский район Минской области). Годы исследований характеризовались контрастным характером погодных условий вегетационного периода. Первый был отмечен близким к многолетней климатической норме гидротермическим режимом, тогда как второй отличался повышенным температурным фоном при остром дефиците влаги.

Полевые опыты были заложены на участке среднекислого ($pH_{KCl} - 5,5-5,7$), малоплодородного, полностью лишённого растительности остаточного слоя донного торфа высокой степени разложения, представленного осоково-гипновой ассоциацией и содержащего аммонийный и нитратный азот (16–28 мг/кг), а также P_2O_5 и K_2O (55–61 и 33–42 мг/кг соответственно). Схема полевого опыта включала 5 вариантов в пятикратной повторности: **1** – контроль, без внесения удобрений; **2** – луночное внесение под опытные растения в мае и июне полного минерального удобрения $N_{16}P_{16}K_{16}$ кг/га д. в., или 5 г на 1 растение; **3** – некорневая обработка опытных растений препаратом Наноплант; **4** – луночное внесение под опытные растения препарата Гидрогумат методом полива; **5** – некорневая обработка опытных растений препаратом Экосил. В каждом варианте опыта было высажено по 10 растений каждого сорта голубики.

В качестве полного минерального удобрения использовали «Растворин» марки «Б». Обработку надземных органов растений Экосилом проводили дважды за вегетационный период. Первый раз ее осуществляли в утренние часы в конце первой декады июня, второй раз – в конце первой декады июля, на начальном этапе созревания плодов. Для приготовления рабочего раствора эмульсию Экосила (0,5 мл, или 15 капель) разводили в 3 л теплой воды (40–50 °С), после чего доводили до необходимого объема водой комнатной температуры и тщательно перемешивали. Расход рабочей жидкости при некорневой подкормке составлял 120 мл/раст. Луночное внесение Гидрогумата проводили в те же сроки, что и препарата Экосил. Для приготовления рабочего раствора 40 мл эмульсии Гидрогумата растворяли в 10 л воды. Расход рабочей жидкости при поливе составлял 0,5 л/раст. В отличие от двух предыдущих препаратов, обработка растений Наноплантом производилась, кроме обозначенных выше сроков, еще и в период их цветения – в середине июня, т. е. трижды за вегетационный период. Для приготовления рабочего раствора 30 капель препарата растворяли в 3 л воды. Расход рабочей жидкости при некорневой обработке составлял 120 мл/раст.

В качестве объектов исследований были использованы плоды раннеспелых (*Northcountry*, *Croaton*) и среднеспелых (*Bluecrop*, *Northland*) сортов голубики высокорослой.

Антиоксидантную активность (АОА) этанольных экстрактов из свежих плодов голубики определяли с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) [8, 9], ПО – по методу А. Н. Бояркина [10]; ПФО – с пирокатехином по методу [11], КАТ – по методу А. Н. Баха и А. И. Опарина [12]. Все аналитические определения выполнены в трехкратной биологической повторности. Данные статистически обработаны с использованием программы Excel.

Результаты и их обсуждение. По нашим оценкам, усредненный в двулетнем цикле наблюдений общий уровень АОА этанольных экстрактов из плодов сортов *Northcountry*, *Croaton*, *Bluecrop* и *Northland* варьировался в рамках эксперимента при 30-минутной экспозиции в весьма широких и довольно близких диапазонах значений, составлявших 82,5–105,5; 119,5–149,4; 111,0–125,3 и 119,6–145,7 мкмоль-экв тролокса/г сухого вещества, что было вполне сопоставимо с данными, полученными в ходе экспериментов на минеральной окультуренной почве в Ганцевичском районе Брестской области и на верховом торфе в Докшицком районе Витебской области [13, 14]. Значительная величина приведенных диапазонов варьирования данного признака косвенно свидетельствовала о заметном влиянии на него эдафического фактора и генотипа опытных растений.

Результаты повариантного определения уровня активности окислительно-восстановительных ферментов в сухом веществе плодов данных сортов голубики, приведенные в табл. 1, выявили изменения его значений в обозначенном выше сортовом ряду в соответствующих диапазонах: для КАТ – 5,69–7,41; 4,20–10,60; 4,36–12,30 и 5,22–12,94 мкмоль H_2O_2 /(г·мин), для ПО – 2,01–5,15; 1,91–5,17; 2,04–4,84 и 2,15–4,78 ед. опт. плотн/(г·мин), для ПФО – 84,6–99,1; 94,0–121,6; 43,5–55,3 и 96,2–216,4 ед. опт. плотн/(г·мин). Как видим, наиболее высокой активностью КАТ и ПФО ха-

рактарызавалася сорт *Northland*, тогда как наиболее низкой – в первом случае сорт *Northcountry*, во втором – *Bluecrop*, причем для активности ПО заметных генотипических различий выявлено не было.

Вместе с тем установлено существенное влияние испытываемых агроприемов на уровень антиоксидантной и ферментативной активности плодов голубики, наиболее объективное представление о котором можно составить на основании табл. 2. Так, у раннеспелого сорта *Northcountry* во всех вариантах опыта с применением удобрений наблюдалось заметное повышение (по сравнению с контролем) уровня АОА – на 12–28 %, наиболее существенное при обработках Нано-плантом. Близкое к этому увеличение данного показателя в пределах 8–25 % установлено и у второго раннеспелого сорта – *Croaton*, у которого наибольшее усиление АОА отмечено при внесении Гидрогумата. В отличие от раннеспелых, у среднеспелых сортов голубики позитивный характер ответной реакции в этом плане на испытываемые агроприемы проявился намного слабее. Так, у сорта *Bluecrop*, как и у предыдущего таксона, увеличение уровня АОА относительно контроля было наибольшим при использовании Гидрогумата (не превышало 2–13 %), тогда как у второго среднеспелого сорта *Northland* отмечалось преимущественное отставание от контроля данного показателя на 8–15 %. Приведенные результаты убедительно свидетельствуют о существенном влиянии генотипа растений голубики на изменение уровня АОА плодов под действием эдафического фактора.

Т а б л и ц а 1. Усредненные в двухлетнем цикле исследований показатели активности окислительно-восстановительных ферментов в плодах модельных сортов *V. corymbosum* в вариантах полевого опыта (в пересчете на сухое вещество)

Table 1. Activity indicators averaged over a two-year cycle of studies redox enzymes in fruits of model varieties *V. corymbosum* in field experiment options (in dry matter)

Вариант опыта	Активность КАТ, мкмоль Н ₂ О ₂ /(г·мин)		Активность ПО, ед. опт. плотн/(г·мин)		Активность ПФО, ед. опт. плотн/(г·мин)	
	$\bar{x} \pm s_x$	<i>t</i>	$\bar{x} \pm s_x$	<i>t</i>	$\bar{x} \pm s_x$	<i>t</i>
Сорт <i>Northcountry</i>						
Контроль	5,69 ± 0,08		2,91 ± 0,01		91,9 ± 0,5	
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	7,41 ± 0,17	9,0*	4,13 ± 0,01	94,5*	92,4 ± 0,9	0,5
Наноплант	6,25 ± 0,16	3,2*	2,01 ± 0,01	-69,7*	87,7 ± 0,2	-7,5*
Гидрогумат	7,26 ± 0,08	14,2*	5,15 ± 0,01	137,2*	99,1 ± 1,2	5,7*
Экосил	6,78 ± 0,10	8,5*	3,92 ± 0,01	61,8*	84,6 ± 1,0	-6,7*
Сорт <i>Croaton</i>						
Контроль	4,20 ± 0,10		1,91 ± 0,01		121,6 ± 1,1	
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	6,30 ± 0,09	15,8*	3,72 ± 0,01	221,7*	94,0 ± 0,3	-24,2*
Наноплант	5,72 ± 0,21	6,6*	2,72 ± 0,01	62,7*	102,5 ± 0,3	-16,7*
Гидрогумат	10,60 ± 0,10	44,9*	5,17 ± 0,01	399,3*	106,1 ± 2,3	-6,1*
Экосил	6,86 ± 0,09	19,3*	4,73 ± 0,01	345,4*	107,0 ± 1,8	-7,0*
Сорт <i>Bluecrop</i>						
Контроль	4,36 ± 0,10		2,04 ± 0,01		43,5 ± 0,7	
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	5,61 ± 0,10	8,6*	2,28 ± 0,01	18,6*	49,4 ± 1,5	3,5*
Наноплант	12,30 ± 0,28	26,5*	3,12 ± 0,01	66,1*	50,8 ± 0,4	9,3*
Гидрогумат	5,30 ± 0,01	9,1*	4,84 ± 0,01	216,9*	55,3 ± 0,3	16,3*
Экосил	8,32 ± 0,11	26,3*	4,18 ± 0,01	185,3*	51,5 ± 1,2	6,0*
Сорт <i>Northland</i>						
Контроль	12,94 ± 0,13		2,15 ± 0,01		216,4 ± 1,6	
N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	8,85 ± 0,10	-25,3*	4,78 ± 0,01	322,1*	123,1 ± 0,9	-50,1*
Наноплант	6,56 ± 0,11	-37,9*	2,27 ± 0,01	14,7*	166,7 ± 1,7	-21,2*
Гидрогумат	5,22 ± 0,01	-59,4*	4,61 ± 0,01	190,6*	96,2 ± 1,4	-55,4*
Экосил	10,79 ± 0,12	-12,3*	4,02 ± 0,01	229,0*	175,4 ± 2,6	-13,4*

Примечание. * – статистически значимые по *t*-критерию Стьюдента различия с контролем при *p* < 0,05.

Таблица 2. Относительные различия с контролем вариантов полевого опыта с применением удобрений по характеристикам антиоксидантного комплекса плодов модельных сортов *V. corymbosum*, %Table 2. Relative differences with control of variants field experiment with the use of fertilizers by characteristics antioxidant complex of fruits of model varieties *V. corymbosum*, %

Показатель	Вариант опыта			
	N ₁₆ P ₁₆ K ₁₆	Наноплант	Гидрогумат	Экосил
Сорт <i>Northcountry</i>				
АОА (ДФПГ) через 30 мин	+11,8	+27,9	+17,0	+14,9
Активность КАТ	+30,2	+9,8	+27,6	+19,2
Активность ПО	+41,9	-30,9	+77,0	+34,7
Активность ПФО	–	-4,6	+7,8	-7,9
Совокупный эффект *	+72,1	-25,7	+112,4	+46,0
Сорт <i>Croaton</i>				
АОА (ДФПГ) через 30 мин	+7,6	+10,2	+25,0	+15,8
Активность КАТ	+50,0	+36,2	+152,4	+63,3
Активность ПО	+94,8	+42,4	+170,7	+147,6
Активность ПФО	-22,7	-15,7	-12,7	-12,0
Совокупный эффект	+122,1	+62,9	+310,4	+198,9
Сорт <i>Bluecrop</i>				
АОА (ДФПГ) через 30 мин	+1,9	+9,9	+12,9	+3,6
Активность КАТ	+28,7	+182,1	+21,6	+90,8
Активность ПО	+11,8	+52,9	+137,3	+104,9
Активность ПФО	+13,6	+16,8	+27,1	+18,4
Совокупный эффект	+54,1	+251,8	+186,0	+214,1
Сорт <i>Northland</i>				
АОА (ДФПГ) через 30 мин	-14,0	+3,4	-15,1	-7,7
Активность КАТ	-31,6	-49,3	-59,7	-16,6
Активность ПО	+122,3	+5,6	+114,4	+87,0
Активность ПФО	-43,1	-23,0	-55,5	-18,9
Совокупный эффект	+47,6	-66,7	-0,8	+51,5

Примечание. * – суммарный показатель активности КАТ, ПО и ПФО. Прочерк (–) означает отсутствие статистически значимых по *t*-критерию Стьюдента различий с контролем при $p < 0,05$.

В изменении уровня ферментативной активности в плодах опытных объектов на фоне испытываемых агроприемов в большинстве случаев была выявлена заметная общность тенденций. Она проявилась в существенном его повышении у ПО и КАТ относительно контроля, достигавшем в наиболее результативных вариантах опыта у сорта *Northcountry* 77 и 30 % соответственно, у сорта *Croaton* – 171 и 152, у сорта *Bluecrop* – 137 и 182 %, тогда как у сорта *Northland* подобная активизация (на 114–122 %) была показана только для ПО (табл. 2). Заметим, что у всех сортов голубики наибольшее усиление активности ПО в рамках эксперимента наблюдалось при использовании Гидрогумата, при котором у сортов *Northcountry* и *Northland*, как и при внесении N₁₆P₁₆K₁₆, оно было наиболее значительным в оба сезона. Наряду с этим у всех таксонов голубики весьма существенное увеличение активности ПО, варьировавшееся в сортовом ряду от 19 % у сорта *Northcountry* до 148 % у сорта *Croaton*, отмечено также при обработках Экосилом, причем во втором случае, как и у сортов *Northcountry* и *Northland*, подобный эффект проявился и при внесении N₁₆P₁₆K₁₆. Наименьшую результативность в активизации данного фермента у всех опытных объектов, за исключением сорта *Bluecrop*, показали обработки Наноплантом.

Что касается КАТ, то на фоне испытываемых агроприемов у обоих раннеспелых сортов наблюдалось усиление ее активности, прямо коррелировавшее с аналогичным показателем у ПО. Как следует из табл. 2, наиболее значительным оно было при использовании Гидрогумата, в меньшей степени – при использовании Экосила. Однотипный характер изменений активности КАТ и ПО у сорта *Bluecrop* установлен также на фоне обработок Экосилом, но, в отличие от предыдущих сортов, максимальное усиление активности первого фермента, сочетавшееся с весьма значи-

тельной активизацией второго, выявлено при обработках Наноплантом. На наш взгляд, сходный характер поведения у этой пары ферментов обусловлен тем, что в окисленном состоянии КАТ может работать и как ПО [3]. Заметим, что с синергическим характером взаимодействия КАТ и ПО в плодах голубики мы сталкивались ранее при исследовании ее ответной реакции на применение микробных удобрений МаКлоРа и Бактопина на выработанном торфянике верхового типа [14]. Вместе с тем у сорта *Northland* применение всех видов удобрений способствовало значительному снижению активности КАТ по сравнению с контролем (на 17–60 %), наибольшему – при внесении Гидрогумата. Выявленное нами ранее существенное обогащение плодов данного интродуцента биофлавоноидами при использовании удобрений [15] предполагало усиление активности ПФО, участвующей в метаболизме данных соединений [16]. Общеизвестно также, что применение удобрений оказывает стимулирующее действие на синтез ПФО [17]. Однако ожидаемого активирования данного фермента в плодах голубики в нашем эксперименте не наблюдалось. Более того, на фоне испытываемых агроприемов лишь у сорта *Bluecrop* установлено незначительное увеличение его активности в пределах 14–27 %, сопряженное с показанной выше активизацией ПО и КАТ. У остальных же таксонов голубики выявлен отчетливый антагонизм в изменении уровней активности ПО и КАТ, с одной стороны, и ПФО, с другой, наиболее выраженный у сорта *Northland*, при снижении у него активности последней, особенно при внесении Гидрогумата, до 55 % (табл. 2). При этом у обоих раннеспелых сортов голубики преимущественное снижение активности ПФО по сравнению с контролем было менее существенным, нежели у сорта *Northland*, и не превышало 30 %.

Отсутствие в большинстве случаев ожидаемого увеличения в плодах голубики активности ПФО на фоне испытываемых агроприемов, на наш взгляд, может быть обусловлено недостаточно высокой субстратной специфичностью данного фермента [16], что допускает участие в метаболизме полифенолов других оксидаз, в том числе КАТ и ПО. В последние десятилетия показана полифункциональность ПО, обладающей, помимо пероксидазной, еще и оксидазной функцией, позволяющей переносить электроны в отсутствие пероксидного кислорода на молекулярный кислород. ПО может функционировать также как анаэробная дегидрогеназа, например как NADH-дегидрогеназа, передающая электроны от восстановленных пиридиновых нуклеотидов на разные акцепторы.

Вместе с тем подобная выявленной у большинства таксонов голубики в настоящем эксперименте с применением минеральных и органических удобрений на низинном торфе противоположная направленность изменений активности ПО и КАТ, с одной стороны, и ПФО, с другой, была установлена нами также в аналогичных исследованиях с использованием микробных удобрений при выращивании данной культуры на выработанном торфянике верхового типа [14]. Сходный характер данных закономерностей наводит на мысль о специфичности ответной реакции оксидазного комплекса генеративных органов представителей рода *Vaccinium* на разные приемы усиления их минерального питания независимо от типа субстрата.

Тем не менее в степени восприимчивости ферментного комплекса плодов голубики к испытываемым агроприемам отчетливо проявились генотипические и межвариантные различия, интегральное представление о которых можно составить по суммарной величине отклонений от контроля (с учетом их знака) активности трех исследуемых оксидаз в вариантах опыта с применением удобрений (см. табл. 2). Нетрудно убедиться, что в таксономическом ряду интродуцента наиболее выраженным позитивным ответом оксидазного комплекса плодов на испытываемые агроприемы характеризовались сорта *Croaton* и *Bluecrop*, показавшие на фоне всех без исключения испытываемых агроприемов повышение суммарного уровня ферментативной активности на 63–310 и 54–252 % соответственно при наибольших значениях в первом случае при внесении Гидрогумата, во втором – при обработках Наноплантом. Заметно слабее подобный стимулирующий эффект от применения удобрений проявился у сортов *Northcountry* и *Northland*, характеризовавшихся довольно близкими позитивными изменениями исследуемого показателя в пределах 48–72 и 46–52 % при внесении $N_{16}P_{16}K_{16}$ и обработках Экосилом на фоне его снижения на 26–67 % при обработках Наноплантом. При этом использование Гидрогумата способствовало наибольшему в эксперименте увеличению оксидазной активности плодов раннеспелого сорта *Northcountry*

на 112 %, тогда как у среднеспелого сорта *Northland* заметных изменений данного показателя выявлено не было.

Как видим, в большинстве случаев испытываемые агроприемы способствовали повышению общего уровня оксидазной активности плодов голубики на 30–310 % относительно контроля, при наиболее высокой эффективности органических удобрений, особенно Гидрогумата. При этом обработки Наноплантом оказывали ингибирующее действие на ферментативную активность плодов сортов *Northcountry* и *Northland* и стимулирующее на ферментативную активность сортов *Croaton* и *Bluecrop*.

Заключение. Результаты исследования влияния минеральных и органических удобрений – $N_{16}P_{16}K_{16}$, Нанопланта, Гидрогумата и Экосила – на состояние антиоксидантного комплекса плодов раннеспелых (*Northcountry*, *Croaton*) и среднеспелых (*Bluecrop*, *Northland*) сортов голубики высокорослой на выработанном торфянике низинного типа в центральной агроклиматической зоне Беларуси показали существенную зависимость изменения уровня их антиоксидантной и ферментативной активности от генотипа растений и вида удобрений.

У большинства сортов усиление минерального питания способствовало повышению уровня АОА до 28 %, наиболее значительному при использовании Нанопланта и Гидрогумата. Выявлен отчетливый антагонизм в изменении активности ПО и КАТ, с одной стороны, и ПФО, с другой, по сравнению с контролем, проявившийся в синхронном ее увеличении у первой пары ферментов до 77 и 30 % у сорта *Northcountry*, 171 и 152 % у сорта *Croaton*, 137 и 182 % у сорта *Bluecrop* и до 122 % у сорта *Northland* (только для ПО) на фоне преимущественного снижения активности ПФО на 13–55 %.

В большинстве случаев испытываемые агроприемы обуславливали повышение общего уровня оксидазной активности плодов голубики на 30–310 %, особенно у сортов *Croaton* и *Bluecrop*, при наибольшей эффективности органических удобрений, особенно Гидрогумата, тогда как обработки Наноплантом оказывали на него ингибирующее действие у сортов *Northcountry* и *Northland* и стимулирующее у сортов *Croaton* и *Bluecrop*.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б17-045).

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant B17-045).

Список использованных источников

1. Рубин, Б. А. Об изоферментах пероксидазы в клубнях картофеля / Б. А. Рубин, Е. В. Будилова // Докл. АН СССР. – 1970. – Т. 190, № 3. – С. 722–724.
2. Медведев, С. С. Физиология растений / С. С. Медведев. – СПб. : Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2004. – 336 с.
3. Меньшикова, Е. Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков // Успехи совр. биологии. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 442–455.
4. Формирование биохимического состава плодов видов семейства *Ericaceae* (Вересковые) при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] ; под ред. акад. В. И. Парфенова. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 307 с.
5. Шабанов, А. А. Биоорганические препараты Гидрогумат и Экосил – полезные компоненты в органическом земледелии [Электронный ресурс] / А. А. Шабанов. – Режим доступа : <https://ecosil.by/a27989-ekologicheskoe-zemledelie-rostoregulyatory.html>. – Дата доступа : 05.02.2019.
6. Томсон, А. Э. Торф и продукты его переработки / А. Э. Томсон, Г. В. Наумова. – Минск : Беларус. навука, 2009. – 328 с.
7. Наноплант – белорусский «эликсир урожайности» / Азизбекян С. Г. [и др.] // Беларус. сел. хоз-во. – 2017. – № 3 (155). – С. 3–5.
8. Антиоксидантная и антирадикальная активность *in vitro* экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития / Е. М. Мальцева [и др.] // Медицина в Кузбассе. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 32–38.
9. Dung, T. D. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx* (Roxb) Merr and Perry buds / T. D. Dung, J. M. Kim, C. S. Kang // Food Chem. Toxicol. – 2008. – Vol. 46, N 12. – P. 3632–3639. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.013>
10. Физиологические и биохимические методы анализа растений: практикум / авт.-сост. Г. Н. Чупахина. – Калининград : Калинингр. гос. ун-т, 2000. – 59 с.
11. Кинетические, биохимические и биологические методы анализа. Методические указания к выполнению лабораторных работ по специализации «Кинетические, биохимические и биологические методы анализа» для студентов специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия» / Курган. гос. ун-т ; сост. Л. В. Мосталыгина. – Курган, 2016. – 30 с.

12. Воскресенская, О. Л. Большой практикум по биоэкологии : учеб. пособие / О. Л. Воскресенская, Е. А. Алябьева, М. Г. Половникова. – Йошкар-Ола : Мар. гос. ун-т, 2006. – Ч. 1. – 107 с.
13. Макаревич, А. М. Антиоксидантная активность плодов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium uliginosum* L. / А. М. Макаревич, В. Н. Решетников // Докл. НАН Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 5. – С. 76–80.
14. Влияние минеральных и микробных удобрений на антиоксидантную и ферментативную активность плодов голубики на рекультивируемом участке выработанного торфяника / Ж. А. Рупасова [и др.] // Природопользование. – 2019. – № 2. – С. 231–242.
15. Влияние удобрений на биофлавоноидный комплекс плодов *Vaccinium corymbosum* L. на выбывшем из промышленной эксплуатации торфяном месторождении низинного типа / Ж. А. Рупасова [и др.] // Вестн. Фонда фундам. исслед. – 2019. – № 4. – С. 105–114.
16. Рубин, Б. А. Энзимология и биология дыхания растений / Б. А. Рубин, М. Е. Ладыгина. – М. : Высш. шк., 1966. – 288 с.
17. Пейве, Я. В. Микроэлементы и ферменты / Я. В. Пейве ; Акад. наук Латв. ССР. – Рига : Изд-во Акад. наук Латв. ССР. – 1960. – 136 с.

References

1. Rubin B. A., Budilova E. V. About peroxidase isoenzymes in potato tubers. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Doklady of the Academy of Sciences of USSR], 1970, vol. 190, no. 3, pp. 722–724 (in Russian).
2. Medvedev S. S. *Plant physiology: a textbook*. St. Petersburg, St. Petersburg State University, 2004. 336 p. (in Russian).
3. Men'shikova E. B., Zenkov N. K. Antioxidants and radical oxidation inhibitors. *Uspekhi sovremennoi biologii* [Successes of modern times biology], 1993, vol. 113, no. 4, pp. 442–455 (in Russian).
4. Rupasova Zh. A., Reshetnikov V. N., Vasilevskaya T. I., Yakovlev A. P., Pavlovskii N. B. *Formation of the biochemical composition of fruits of species of the Ericaceae family during introduction under the conditions of Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 307 p. (in Russian).
5. Shabanov A. A. *Bioorganic preparations Hydrohumate and Ecosil – useful components in organic farming*. Available at: <https://ecosil.by/a27989-ekologicheskoe-zemledelie-rostoregulyatory.html> (accessed 05.02.2019) (in Russian).
6. Tomson A. E., Naumova G. V. *Peat and products of its processing*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2009. 328 p. (in Russian).
7. Azizbekyan S., Domash V., Brui I., Stepuro M. Nanoplant – Belarusian “elixir of productivity”. *Belorusskoe sel'skoe khozyaistvo* [Belarusian agriculture], 2017, no. 3 (155), pp. 3–5 (in Russian).
8. Mal'tseva E. M., Egorova N. O., Egorova I. N., Mukhamadiyarov R. A. Antioxidant and antiradical activity *in vitro* of herb extracts of *Sanguisorba officinalis* L., gathered in various development stages. *Meditina v Kuzbasse* [Medicine in the Kuzbass], 2017, vol. 16, no. 2, pp. 32–38 (in Russian).
9. Dung T. D., Kim J. M., Kang C. S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx* (Roxb) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, vol. 46, no. 12, pp. 3632–3639. <https://doi.org/10.1016/j.ftc.2008.09.013>
10. Chupakhina G. N. *Physiological and biochemical methods of plant analysis: workshop*. Kaliningrad, Kaliningrad State University Publ., 2000. 59 p. (in Russian).
11. Mostalygina L. V. (comp.). *Kinetic, biochemical and biological methods of analysis. Methodological guidelines for laboratory work of specialization “Kinetic, biochemical and biological methods of analysis” for students of 04.05.01 specialty “Fundamental and applied chemistry”*. Kurgan, Kurgan State University Publ., 2016. 30 p. (in Russian).
12. Voskresenskaya O. L., Alyabysheva E. A., Polovnikova M. G. *A large workshop on bioecology. Part 1*. Yoshkar-Ola, Mari State University Publ., 2006. 107 p. (in Russian).
13. Makarevich A. M., Reshetnikov V. N. Antioxidant activity of fruits *Vaccinium corymbosum* L. and *Vaccinium uliginosum* L. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2011, vol. 55, no. 5, pp. 76–80 (in Russian).
14. Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Yaroshuk A. A., Zadalya V. S., Kolomiets E. I., Aleshchenkova Z. M., Lishtvan I. I. The effect of mineral and microbial fertilizers on the antioxidant and enzymatic activity of blueberry fruits in the recultivated area of developed peat bog. *Prirodopol'zovanie* [Nature management], 2019, no. 2, pp. 231–242 (in Russian).
15. Rupasova Zh. A., Yakovlev A. P., Savos'ko I. V., Vasilevskaya T. I., Krinitskaya N. B., Zadalya V. S., Domash V. I., Azizbekyan S. G., Karbanovich T. M. The effect of fertilizers on the bioflavonoid complex of fruits *Vaccinium corymbosum* L. on the opencast peatland of the lowland type. *Vestnik Fonda fundamental'nykh issledovaniy = Vestnik of the Foundation for fundamental research*, 2019, no. 4, pp. 105–114 (in Russian).
16. Rubin B. A., Ladygina M. E. *Enzymology and biology of plant respiration*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1966. 288 p. (in Russian).
17. Peive J. V. *Micronutrients and enzymes*. Riga, Publishing House of the Academy of Sciences of the Latvian SSR, 1960. 136 p. (in Russian).

Информация об авторах

Рупасова Жанна Александровна – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by

Яковлев Александр Павлович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Савоско Ирина Валерьевна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Белый Павел Николаевич – канд. биол. наук, уч. секретарь. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Домаш Валентина Иосифовна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Азизбекян Сергей Гургенович – ст. науч. сотрудник, руководитель группы. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, г. Минск, Республика Беларусь).

Лисхтван Иван Иванович – академик, д-р техн. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 10, 220114, г. Минск, Республика Беларусь).

Гончарова Людмила Владимировна – канд. биол. наук, заместитель директора. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Information about the authors

Zhanna A. Rupasova – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by

Aleksandr P. Yakovlev – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Irina V. Savosko – Junior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Pavel N. Bely – Ph. D. (Biol.), Scientific Secretary. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Valentina I. Domash – D. Sc. (Biol.), Chief Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Sergey G. Azizbekyan – Senior Researcher, Head of the group. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Ivan I. Lishtvan – Academician, D. Sc. (Engineering), Professor, Chief Researcher. Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skoryna Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus).

Ljudmila V. Goncharova – Ph. D. (Biol.), Deputy Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 615.322: 616.5-003.93

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-33-42>

Поступила в редакцию 11.11.2021

Received 11.11.2021

**Н. Ю. Адамцевич¹, Е. В. Феськова¹, В. Н. Леонтьев¹, И. П. Жаворонок²,
А.-М. В. Ерофеева², С. В. Маньковская², В. В. Титок³**

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЕЛЕВОЙ СУБСТАНЦИИ
НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЭКСТРАКТОВ
БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО (*HELICHRYSUM ARENARIUM* L.)
И ВОРОБЕЙНИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*LITHOSPERMUM OFFICINALE* L.)**

Аннотация. Изучено ранозаживляющее действие гелевых субстанций, содержащих 2 и 4 % сухих экстрактов цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в соотношении 1:1.

Установлено, что накожные аппликации данных гелевых субстанций способствуют формированию структурно-функционального регенерата в зоне раневого дефекта и достоверному сокращению продолжительности заживления полнослойных линейных ран у крыс по сравнению с аналогичными показателями как у животных контрольной группы (без лечения), так у животных, получивших лечение референтным препаратом. Применение исследуемых гелей, независимо от содержания в них растительных экстрактов (2 или 4 %), не сопровождалось токсическими эффектами.

Ключевые слова: бессмертник песчаный (*Helichrysum arenarium* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.), экстракты, флавоноиды, гелевая субстанция, полнослойная линейная рана, ранозаживление

Для цитирования: Ранозаживляющие свойства гелевой субстанции на основе комплекса флавоноидов из экстрактов бессмертника песчаного и воробейника лекарственного / Н. Ю. Адамцевич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 33–42. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-33-42>

**Natallia Yu. Adamtsevich¹, Alena V. Feskova¹, Victor N. Leontiev¹, Irina P. Zhavoronok²,
Anna-Maria V. Yerofeyeva², Svetlana V. Mankovskaya², Vladimir V. Titok³**

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**WOUND-HEALING EFFECT OF THE GEL SUBSTANCE BASED ON THE FLAVONOIDS COMPLEX
FROM EXTRACTS OF THE EVERLASTING (*HELICHRYSUM ARENARIUM* L.)
AND THE LITTLEWALE (*LITHOSPERMUM OFFICINALE* L.)**

Abstract. The study of wound-healing effect of the gel substances with 2 and 4 % (w/w) concentrations of the dry extracts of the everlasting flowers and of the littlewale leaves in the ratio 1:1 were carried out.

It was found that the skin application of the studied gel substances promoted the formation of the structural and functional regenerate in the area of the wound defect. The studied gel contributed to the significant reduction of the healing duration of the full-thickness linear wounds in rats compared to the control group of animals (without treatment) and to the group of animals that received treatment with the reference listed drug. The use of the studied gels, regardless of the content of the plant extracts in them (2 or 4 % (w/w)), was not accompanied by toxic effects.

Keywords: everlasting (*Helichrysum arenarium* L.), littlewale (*Lithospermum officinale* L.), extracts, flavonoids, gel substance, full-thickness linear wound, wound healing

For citation: Adamtsevich N. Yu., Feskova A. V., Leontiev V. N., Zhavoronok I. P., Yerofeyeva A.-M. V., Mankovskaya S. V., Titok V. V. Wound-healing effect of the gel substance based on the flavonoids complex from extracts of the everlasting and the littlewale. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 33–42 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-33-42>

Введение. Изучение раневых процессов различной этиологии является важным вопросом в современной биологии и медицине. При этом значительное увеличение числа пациентов с дефектами кожного покрова обуславливает актуальность поиска, изучения и внедрения в клиническую практику новых эффективных и безопасных ранозаживляющих препаратов.

Заживление ран представляет собой сложный биологический процесс, состоящий из серии последовательных этапов, направленных на восстановление поврежденной ткани [1, 2]. Препараты, применяемые для местного лечения ран, должны обладать определенными противовоспалительными и репаративными эффектами, улучшать условия регионарной микроциркуляции [1]. Вместе с тем наблюдаются затруднения при лечении пациентов с раневыми повреждениями кожи вследствие резистентности микробиоты к антибактериальным препаратам, повышенного аллергического фона, а также наличия побочных эффектов при использовании большинства лекарственных средств [3].

В настоящее время наблюдается возрастающий спрос на фармакологические средства природного происхождения (фитопрепараты и неогаленики), которые, в отличие от синтетических лекарственных средств, характеризуются возможностью длительного применения, низкой токсичностью, простотой приготовления и применения.

Одним из наиболее распространенных классов биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения являются флавоноиды, которые, по результатам различных клинических исследований, обладают широким спектром терапевтического действия, в том числе ранозаживляющего [4–21].

Предполагается, что ранозаживляющее действие БАВ связано с антиоксидантной активностью веществ: антиоксиданты значительно ускоряют заживление ран, удаляя свободные радикалы кислорода и увеличивая синтез коллоидов [4]. В частности, выполняются исследования по изучению местного применения флавоноидов, их влияния на лечение атопического дерматита, псориаза, инфекционных заболеваний кожи [5–7], ожогов, вызванных УФ-радиацией [8–11]. Установлено, что флавоноиды оказывают ранозаживляющее действие после термических [12–15] и химических ожогов [16, 17], уменьшают фиброзное образование ткани [11, 18], а также усиливают регенерационные процессы в патологических условиях, например при сахарном диабете [19–21].

Для лечения различных типов ран предлагается применение флавоноидов, предпочтительно группы флавонов [22]. Доказано, что данный класс соединений способствует ускорению лечения кожных повреждений. Исследование свойств регенерации тканей с помощью различных представителей флавоноидов показало, что лучшим эффектом обладают такие флаванолы, как кемпферол, кверцетин и фисетин и их гликозиды [23].

При анализе лекарственных растений, культивируемых в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси, в экстракте воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) идентифицирован гликозид кверцетина – изокверцитрин, содержание которого достигает 3,5–4,0 мг/г абсолютно сухого сырья, а в экстракте бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) – кемпферол-3-β-D-глюкопиранозид с содержанием 4,0 мг/г абсолютно сухого сырья [24–26]. Следовательно, экстракты данных видов растений могут применяться при разработке фитопрепарата ранозаживляющего действия.

Целью данной работы являлось исследование ранозаживляющей активности гелевой субстанции, в состав которой входят экстракты цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного, содержащих комплекс флавоноидов.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись гелевые субстанции, содержащие в качестве действующих веществ комплекс флавоноидов из экстрактов цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в количестве 2 и 4 % от массы геля. Для получения экстрактов растительное сырье экстрагировали при ранее подобранных оптимальных параметрах [27, 28]. Основой геля являлся фосфатный буферный раствор (для поддержания уровня pH), в качестве гелеобразователя использовали карбопол 980. В гелевую основу добавляли сухие экстракты цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в массовом соотношении 1:1. Для обеспечения микробиологической чистоты при хранении и применении геля в качестве консервантов использовали метилпарагидроксибензоат (метилпарабен) и пропилпарагидроксибензоат (пропилпарабен).

Образцы геля получали в лабораторных условиях на кафедре биотехнологии Белорусского государственного технологического университета. Оценку ранозаживляющего действия выпол-

няли на базе Института физиологии НАН Беларуси с использованием экспериментальной модели полнослойной линейной раны на 80 крысах линии Wistar (40 самцах и 40 самках) одного возраста и массой 200–250 г.

Известно, что ускорению процесса регенерации тканей, более быстрой эпителизации, заживлению язв и эрозий способствуют цветки календулы, которые содержат каротиноиды (до 3 %), эфирное масло (0,02 %), флавоноиды (до 4 %) [29]. Поэтому в качестве референтного лекарственного препарата использовали «Мазь календулы» (производитель – ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» (ОАО «БЗМП»)).

В соответствии с санитарно-гигиеническими нормами подопытные животные находились в клетках на стандартном рационе и имели свободный доступ к воде и пище. В помещении, где содержались клетки с животными, контролировали условия окружающей среды: температура воздуха – 19–25 °С, относительная влажность – 50–70 %, световой режим – 12/12 (день/ночь) [30]. Температуру и влажность воздуха регистрировали ежедневно.

С целью адаптации животных они находились на карантине в течение 14 сут до начала эксперимента.

За день до начала исследования опытные животные, которые соответствовали критериям включения в эксперимент (активные, подвижные, с гладким и блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающие корм), были распределены методом рандомизации на 4 группы, по 10 самцов и 10 самок в каждой (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Распределение экспериментальных животных по группам

Table 1. Distribution of experimental animals into groups

Группа животных	Описание группы
Контрольная	Животные, полнослойные линейные раны которых не обрабатывали (без лечения)
Гель 2 %	Животные, полнослойные линейные раны которых обрабатывали гелем, содержащим растительные экстракты в количестве 2 %
Гель 4 %	Животные, полнослойные линейные раны которых обрабатывали гелем, содержащим растительные экстракты в количестве 4 %
«Мазь календулы»	Животные, полнослойные линейные раны которых обрабатывали референтным препаратом «Мазь календулы» (позитивный контроль)

Все эксперименты выполняли с соблюдением принципов биоэтики и в соответствии с национальным и международным стандартами качества планирования и проведения исследований [31].

Моделирование линейной кожной раны у лабораторных животных проводили под общим наркозом (тиопентал натрия, 20 мг/кг, внутривенно). В область будущей раны для обезболивания вводили внутримышечно 100 мкл 5 %-ного раствора лидокаина гидрохлорида (ОАО «БЗМП»). Для предотвращения пересыхания глазного яблока на слизистую глаз наносили 0,5 мг карбомера «Офтагель» (Santen OY). После исчезновения реакций на болевой (пощипывание лапы пинцетом) и звуковой (хлопок) стимулы на дорсальной поверхности животных выстригали шерсть, а затем вдоль позвоночника выбривали полоску шириной 20 мм и длиной 30 мм. Посередине выбритого участка, предварительно обработанного 5 %-ным раствором йода (ОАО «БЗМП»), по шаблону наносили рану длиной 25 мм до фасции, посередине разреза накладывали один шов (нить «Сургикрол», ООО «Футберг»), сближающий края раны и обеспечивающий регенерацию раны от краев к центру.

Прооперированных крыс помещали в теплое место для выхода из наркоза. После операции животных содержали в отдельных клетках на обычном рационе со свободным доступом к воде.

Референтный препарат и исследуемые образцы геля наносили на поврежденные участки кожи крыс ежедневно, начиная со следующего дня после формирования ран и до полного заживления повреждения.

Ранозаживляющее действие оценивали по характеру клинического течения процесса заживления (наличие нагноения, продолжительность полного отторжения струпа, наличие или отсутствие вторичного инфицирования, продолжительность и динамика полного срастания краев раны).

Для статистического анализа полученных результатов использовали стандартные пакеты прикладных программ Microsoft Excel с определением среднего арифметического значения и его стандартной ошибки $M \pm m$. Проверку на нормальность распределения количественных показателей осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. Для сравнительного анализа количественных переменных применяли t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Динамический мониторинг общего состояния животных и течения раневого процесса позволял оценить ход восстановления поврежденной ткани и влияние исследуемых образцов геля на продолжительность заживления ран. Общее состояние и поведение крыс в целом было удовлетворительным: у животных наблюдались активность, подвижность, реакция на раздражители, нормальные пищевая активность и водопотребление. Видимые слизистые оболочки (носовой и ротовой полостей, анального отверстия, конъюнктивы) были бледные, чистые, без изъязвлений. Патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. Динамика изменения массы тела подопытных крыс (как самцов, так и самок) на протяжении всего исследования была положительной (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Изменение массы тела опытных животных
T a b l e 2. Change in the body weight of the experimental animals

Группа животных	Масса тела, г				
	до операции	на 5-е сутки	на 9-е сутки	на 15-е сутки	Δ , %
Самцы					
Контрольная	261,7 ± 6,0	290,8 ± 5,3	289,8 ± 5,7	302,5 ± 7,5	15,6
«Мазь календулы»	236,6 ± 5,2	247,3 ± 7,5	268,6 ± 8,7	278,1 ± 10,5	17,5
Гель 2 %	263,3 ± 5,6	273,5 ± 5,9	280,7 ± 4,1	290,5 ± 9,0	10,7
Гель 4 %	280,0 ± 12,1	293,7 ± 12,0	301,5 ± 9,1	309,8 ± 6,7	11,8
Самки					
Контрольная	223,2 ± 5,9	234,5 ± 3,8 [#]	229,8 ± 3,8	241,5 ± 4,7 [#]	8,2
«Мазь календулы»	232,8 ± 4,6	228,0 ± 3,2	226,6 ± 4,5	233,0 ± 5,4	1,75
Гель 2 %	234,4 ± 7,1	247,9 ± 5,8 [#]	246,3 ± 5,7 [#]	245,0 ± 6,0 [#]	4,5
Гель 4 %	234,8 ± 4,5	241,4 ± 4,5	244,0 ± 4,4 [#]	246,9 ± 5,1 [#]	5,2

П р и м е ч а н и е. # – $p \leq 0,05$ по отношению к показателям до операции.

Процессы заживления полнослойных линейных ран кожи у самок и самцов представлены в табл. 3 и 4 соответственно.

Ранозаживление в контрольной группе осуществлялось от краев раны к центру смешанным натяжением – как первичным, так и вторичным. В 1-е–3-и сутки после нанесения линейной раны у всех животных отмечались гиперемия, болезненность, локальное повышение температуры (фаза воспаления). На 4–7-е сутки отечность спадала, при пальпации рана была безболезненная, образовавшийся струп отходил по краям (фаза регенерации). На 12–14-е сутки струп отпадал и образовывался рубец (фаза рубцевания). У 30 % животных раневые поверхности не прилегали друг к другу, возникала грануляционная ткань, которая в ходе заживления превращалась в рубцовую ткань (вторичное натяжение).

Длительность заживления экспериментальных ран в контрольной группе составила: у самцов – $12,33 \pm 0,62$ сут, у самок – $12,67 \pm 0,62$ сут.

У экспериментальных животных обоего пола, которым проводили лечение референтным препаратом, фаза воспаления отмечалась в течение первых 2 сут. Начиная с 3-х суток наблюдалось плавное и постепенное уменьшение размеров ран (фаза регенерации). Струп отпадал у большинства экспериментальных животных на 9-е сутки, после чего начиналась фаза рубцевания. Полное заживление ран у самцов отмечалось через $11,75 \pm 0,16$ сут, у самок – через $11,63 \pm 0,18$ сут.

У животных в экспериментальных группах, где применялись гелевые субстанции, содержащие экстракты цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в коли-

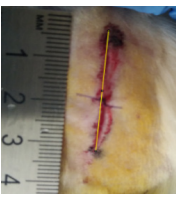
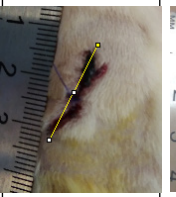

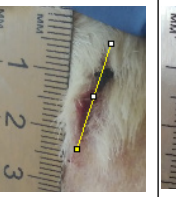
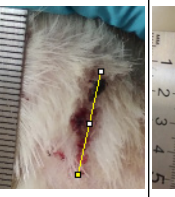

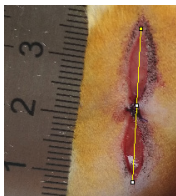



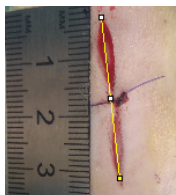
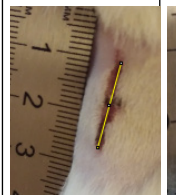
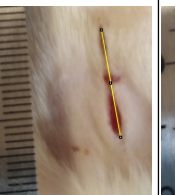
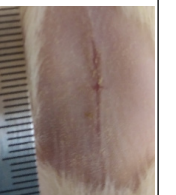
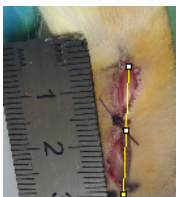
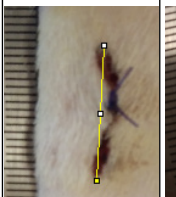


честве 2 и 4 %, фаза воспаления наблюдалась только в течение первых суток с момента наложения на рану исследуемых субстанций. Заживление протекало с образованием струпа на 4–5-е сутки (фаза регенерации) и последующим его отхождением на 6–7-е сутки (фаза рубцевания). На месте раны образовывалась новая ткань без выраженного рубцевания.

Следовательно, у экспериментальных животных кожные аппликации гелевой субстанции, содержащей 2 и 4 % растительных экстрактов, способствовали достоверному сокращению продолжительности заживления линейных ран по сравнению с таковой у животных контрольной группы (без лечения): при применении геля 2 % – в среднем на 3,67 сут (30,82 %; $p = 0,00017$); при применении геля 4 % – на 3,79 сут (30,33 %; $p = 0,00012$). Лучший ранозаживляющий эффект от применения исследуемого геля наблюдался и по сравнению с таковым у животных, получивших лечение референтным препаратом: при применении геля 2 % – в среднем на 3,04 сут (26,01 %; $p = 0,00024$); при применении геля 4 % – на 2,98 сут (25,49 %; $p = 0,00021$).

Продолжительность репарации ран после применения препарата «Мазь календулы» практически не отличалась от продолжительности репарации ран у животных контрольной группы (разница в сроках репарации составила в среднем 0,81 сут (6,48 %; $p = 0,1676$)).


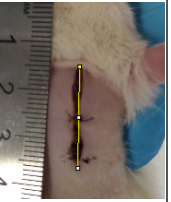

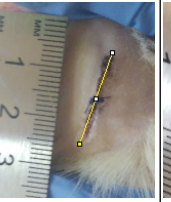
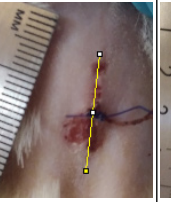

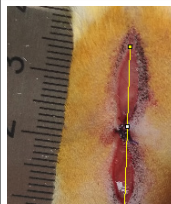
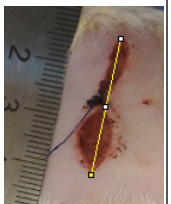
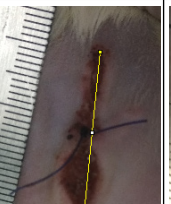
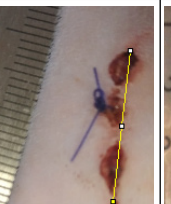

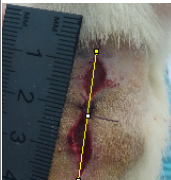
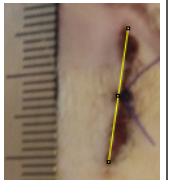
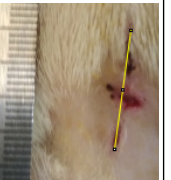
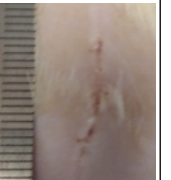

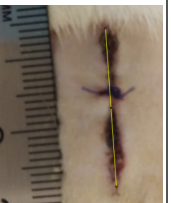
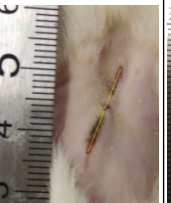
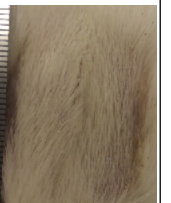
Таблица 3. Заживление полнослойных линейных ран кожи у самок

Table 3. Healing of the full-thickness linear skin wounds in female

Группа животных	Средняя длина раны, см					
	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	8-е сутки	10-е сутки	12-е сутки
Контрольная						
	$2,21 \pm 0,15$	$1,93 \pm 0,05$	$2,01 \pm 0,06$	$1,80 \pm 0,13$	$1,18 \pm 0,19$	$0,31 \pm 0,15$
«Мазь календулы»						–
	$2,43 \pm 0,07$	$2,35 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,06$	$1,42 \pm 0,06$	$0,00 \pm 0,00$	–
Гель 2 %					–	–
	$2,53 \pm 0,17$	$1,82 \pm 0,08$	$1,49 \pm 0,06$	$0,00 \pm 0,00$	–	–
Гель 4 %					–	–
	$2,42 \pm 0,10$	$1,86 \pm 0,11$	$1,38 \pm 0,08$	$0,00 \pm 0,00$	–	–

Т а б л и ц а 4. Заживление полнослойных линейных ран кожи у самцов

T a b l e 4. Healing of the full-thickness linear skin wounds in males

Группа животных	Средняя длина раны, см					
	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки	8-е сутки	10-е сутки	12-е сутки
Контрольная						
	$2,63 \pm 0,08$	$2,19 \pm 0,07$	$2,41 \pm 0,13$	$1,93 \pm 0,08$	$1,65 \pm 0,20$	$0,30 \pm 0,14$
«Мазь календулы»						—
	$2,59 \pm 0,07$	$2,37 \pm 0,08$	$1,91 \pm 0,18$	$1,23 \pm 0,13$	$0,00 \pm 0,00$	—
Гель 2 %					—	—
	$2,34 \pm 0,17$	$1,91 \pm 0,10$	$1,49 \pm 0,14$	$0,00 \pm 0,00$	—	—
Гель 4 %					—	—
	$2,76 \pm 0,17$	$2,14 \pm 0,09$	$1,70 \pm 0,13$	$0,00 \pm 0,00$	—	—

Результаты продолжительности заживления полнослойных линейных ран кожи у крыс представлена в табл. 5.

Т а б л и ц а 5. Продолжительность заживления полнослойных линейных ран кожи у крыс, сут

T a b l e 5. Duration of healing of full-thickness linear skin wounds in rats, days

Группа животных	Фаза воспаления	Фаза регенерации	Фаза рубцевания	Продолжительность заживления экспериментальных ран	
				Самцы	Самки
Контрольная	1–3	4–7	12–14	$12,33 \pm 0,62$	$12,67 \pm 0,62$
«Мазь календулы»	1–2	3–8	9–10	$11,75 \pm 0,16$	$11,63 \pm 0,18$
Гель 2 %	1	4–5	6–7	$8,67 \pm 0,21$	$8,63 \pm 0,18$
Гель 4 %	1	4–5	6–7	$8,67 \pm 0,33$	$8,75 \pm 0,31$

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что содержание растительных экстрактов в исследуемом геле (2 либо 4 %) незначительно влияет на его ранозаживляющую активность. Следовательно, для получения гелевой субстанции, обладающей ранозаживляющим действием, достаточно 2 % от массы геля экстрактов цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного в массовом соотношении 1:1.

Заклучение. На эксперыментальнай модели полнослойной линейной раны у крыс линии Wistar исследована ранозаживляющая активность гелевой субстанции на основе комплекса флавоноидов из экстрактов бессмертника песчаного и воробейника лекарственного. Установлено, что у эксперыментальных животных кожные аппликации геля, содержащего 2 и 4 % растительных экстрактов, способствовали достоверному сокращению продолжительности заживления полнослойных линейных ран по сравнению с таковой у животных контрольной группы (без лечения) в среднем на 3,67 и 3,79 сут соответственно, а у животных, лечение которых проводили референтным препаратом «Мазь календулы», – в среднем на 3,04 и 2,98 сут соответственно.

Совокупность полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что исследуемые гели на основе экстрактов из цветков бессмертника песчаного и листьев воробейника лекарственного обладают выраженными репаративными свойствами.

Список использованных источников

1. Абаев, Ю. К. Биология заживления острой и хронической раны / Ю. К. Абаев // Мед. новости. – 2003. – № 6. – С. 3–10.
2. Mercandetti, M. Wound healing, healing and repair [Electronic resource] / M. Mercandetti. – Mode of access: <https://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>. – Date of access: 11.10.2021.
3. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.
4. Sudsai, T. Wound healing property of isolated compounds from *Boesen bergia* kingie rhizomes / T. Sudsai, C. Wattanapiromsakul, S. Tewtrakul // J. Ethnopharmacol. – 2016. – Vol. 184. – P. 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.001>
5. Kim, B. *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and suppression of inflammatory cytokines / B. Kim, Y. E. Choi, H. S. Kim // Phytother. Res. – 2014. – Vol. 28, N 9. – P. 1359–1366. <https://doi.org/10.1002/ptr.5138>
6. Regulation of late cornified envelope genes relevant to psoriasis risk by plant-derived cyaniding / H. R. Austin [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2014. – Vol. 443, N 4. – P. 1275–1279. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.128>
7. Шубина, В. С. Мишени действия флавоноидов при регенерации кожи / В. С. Шубина, Ю. В. Шаталин // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация: сб. ст.: в 2 т. / под ред. В. П. Зинченко, А. В. Бережнова. – Пушино, 2015. – Т. 2. – С. 717–722.
8. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin / J. Y. Lin [et al.] // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. – 2008. – Vol. 24, N 2. – P. 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2008.00329.x>
9. Photochemoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice / E. D. Olteanu [et al.] // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. – 2012. – Vol. 31, N 3. – P. 233–243. <https://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v31.i3.50>
10. Active ingredients against human epidermal aging / M. Lorencini [et al.] // Ageing Res. Rev. – 2014. – Vol. 15. – P. 100–115. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.002>
11. Quercetin inhibits radiation-induced skin fibrosis / H. Jason [et al.] // Rad. Res. – 2013. – Vol. 180, N 2. – P. 205–215. <https://doi.org/10.1667/rr3237.1>
12. The effect of *Lithospermum officinale*, silver sulfadiazine and alpha ointments in healing of burn wound injuries in rat / Z. M. Amiri [et al.] // World J. Plast. Surg. – 2017. – Vol. 6, N 3. – P. 313–318.
13. Phytochemical screening and wound healing activity of *Telephium imperati* (L.) in rats / R. Nejari [et al.] // South African J. Botany. – 2019. – Vol. 123. – P. 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.023>
14. Олифирова, О. С. Значение антиоксидантов и гипербарической оксигенации в лечении ожоговых ран / О. С. Олифирова, А. А. Козка // Новости хирургии. – 2017. – Т. 25, № 2. – С. 148–154.
15. Evaluation of burn wound healing potential of aqueous extract of *Morus alba* based cream in rats / N. Bhatia [et al.] // J. Phytopharmacol. – 2014. – Vol. 3, N 6. – P. 378–383.
16. Шубина, В. С. Влияние липосомных препаратов на основе комплексов таксифолина с металлами переменной валентности на регенерацию кожи при химическом ожоге / В. С. Шубина, Ю. В. Шаталин // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 3. – С. 251–260.
17. Шубина, В. С. Регенерация кожи после химического ожога в присутствии препаратов на основе производных таксифолина / В. С. Шубина, Ю. В. Шаталин // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 3. – С. 160–166.
18. Черняков, А. В. Профилактика и лечение патологических рубцов в хирургической практике / А. В. Черняков // Хирургия. – 2017. – № 28. – С. 2063–2068.
19. Wound healing effect of naringin gel in alloxan induced diabetic mice / M. E. Okur [et al.] // Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi. – 2020. – Vol. 44, N 3. – P. 397–414. <https://doi.org/10.33483/jfpau.742224>
20. Lodhi, S. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats / S. Lodhi, A. K. Singhai // Asian Pacif. J. Tropic. Med. – 2013. – Vol. 6, N 4. – P. 253–259. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(13\)60053-x](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(13)60053-x)

21. Wound healing effect of kaempferol in diabetic and nondiabetic rats / Y. Özyay [et al.] // *J. Surg. Res.* – 2019. – Vol. 233. – P. 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.08.009>
22. Use of flavonoids in manufacturing compositions for wound healing [Electronic resource] / US 10376488 B2. Patents. google.com. – Mode of access: <https://patentimages.storage.googleapis.com/09/17/26/38b18e4fca1753/US10376488.pdf>. – Date of access: 11.10.2021.
23. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource] / WO2012/047763 A2. – Patents. google.com. – Mode of access: <https://patentimages.storage.googleapis.com/d6/56/fa/a0aa6fa59f4816/WO2012047763A2.pdf>. – Date of access: 11.10.2021.
24. Условия экстракции и идентификации флавоноидов, стимулирующих регенерацию тканей / Е. В. Феськова [и др.] // *Тр. БГТУ. Сер. 2. Химические технологии, биотехнологии, геоэкология.* – 2019. – № 1. – С. 49–53.
25. Адамцевич, Н. Ю. Извлечение флавоноидов из воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) и цмина песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) / Н. Ю. Адамцевич, Е. В. Феськова, В. С. Болтовский // *Тр. БГТУ. Сер. 2. Химические технологии, биотехнологии, геоэкология.* – Минск, 2020. – № 1. – С. 93–97.
26. Экстракция флавоноидов из листьев воробейника лекарственного *Lithospermum officinale* L. (Boraginaceae) с использованием СВЧ-энергии / Н. Ю. Адамцевич [и др.] // *Химия раст. сырья.* – 2021. – № 1. – С. 85–92.
27. Адамцевич, Н. Ю. Экстракция флавоноидов из цветков бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.) / Н. Ю. Адамцевич, В. С. Болтовский, В. В. Титок // *Биотехнология: взгляд в будущее : материалы VII Междунар. науч.-техн. конф., Ставрополь, 22–23 апреля 2021 г. / отв. ред. В. Н. Мажаров.* – Ставрополь, 2021. – Ч. 1. – С. 4–7.
28. Адамцевич, Н. Ю. Влияние параметров экстракции на выход флавоноидов из листьев воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) / Н. Ю. Адамцевич, В. С. Болтовский, В. В. Титок // *Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук.* – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 402–411.
29. Кушина, И. В. Календула – популярное лекарственное и декоративное растение / И. В. Кушина, М. Ю. Карпухин // *Аграрное образование и наука.* – 2019. – № 3. – С. 12–17.
30. Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев). Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18–2006. – Утвержден 31.10.2006. – М-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2006.
31. Принципы надлежащей лабораторной практики. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014. – Введ. 01.08.2015. – М. : Стандартинформ, 2015. – 12 с.

References

1. Abaev Yu. K. Biology of acute and chronic wound healing. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2003, no. 3, pp. 3–10 (in Russian).
2. Mercandetti M. *Wound healing, healing and repair.* Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview> (accessed 11.10.2021).
3. Mashkovskii M. D. *Medicines.* Moscow, Novaya volna Publ., 2012. 1216 p. (in Russian).
4. Sudsai T., Wattanapiromsakul C., Tewtrakul S. Wound healing property of isolated compounds from *Boesen bergia* kingie rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, vol. 184, pp. 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.001>
5. Kim B., Choi Y. E., Kim H. S. *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and suppression of inflammatory cytokines. *Phytotherapy Research*, 2014, vol. 28, no. 9, pp. 1359–1366. <https://doi.org/10.1002/ptr.5138>
6. Austin H. R., Hoss E., Batie S. F., Moffet E. W., Jurutka P. W., Haussler M. R., Whitfield G. K. Regulation of late cornified envelope genes relevant to psoriasis risk by plant-derived cyaniding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, vol. 443, no. 4, pp. 1275–1279. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.128>
7. Shubina V. S., Shatalin Yu. V. Targets of the action of flavonoids in skin regeneration. *Retseptory i vnutrikletchnaya signalizatsiya: sbornik statei. Tom 2* [Receptors and intracellular signaling: a collection of articles. Volume 2]. Pushchino, 2015, pp. 717–722 (in Russian).
8. Lin J. Y., Tournas J. A., Burch J. A., Monteiro-Riviere N. A., Zielinski J. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 2008, vol. 24, no. 2, pp. 61–66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2008.00329.x>
9. Olteanu E. D., Filip A., Clichici S., Daicovicu D., Achim M., Postescu I., Bolfa P., Bolojan L., Vlase L., Muresan A. Photochemoprotective effect of *Calluna vulgaris* extract on skin exposed to multiple doses of ultraviolet B in SKH-1 hairless mice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2012, vol. 31, no. 3, pp. 233–243. <https://doi.org/10.1615/jenviroxpatholtoxcolonc.v31i3.50>
10. Lorencini M., Brohem C. A., Dieamant G. C., Zanchin N. I., Maibach H. I. Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews*, 2014, vol. 15, pp. 100–115. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.002>
11. Horton J. A., Li F., Chung E. J., Hudak K., White A., Krausz K., Gonzalez F., Citrin D. Quercetin inhibits radiation-induced skin fibrosis. *Radiation Research*, 2013, vol. 180, no. 2, pp. 205–215. <https://doi.org/10.1667/rr3237.1>
12. Amiri Z. M., Tanideh N., Seddighi A., Mokhtari M., Amini M., Partovi A. S., Manafi A., Hashemi S. S., Mehrabani D. The effect of *Lithospermum officinale*, silver sulfadiazine and alpha ointments in healing of burn wound injuries in rat. *World Journal of Plastic Surgery*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 313–318.

13. Nejari R., Benabbes M., Amrani M., Meddah B., Bouatia M., Taoufik J. Phytochemical screening and wound healing activity of *Telephium imperati* (L.) in rats. *South African Journal of Botany*, 2019, vol. 123, pp. 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.023>
14. Olifirova O. S., Kozka A. A. The value of antioxidants and hyperbaric oxygenation in the treatment of burn wounds. *Novosti khirurgii = Surgery news*, 2017, vol. 25, no. 2, pp. 148–154 (in Russian).
15. Bhatia N., Singh A., Sharma R., Singh A., Soni V., Singh G., Bajaj J., Dhawan R., Singh B. Evaluation of burn wound healing potential of aqueous extract of *Morus alba* based cream in rats. *Journal of Phytopharmacology*, 2014, vol. 3, no. 6, pp. 378–383.
16. Shubina V. S., Shatalin Yu. V. Effect of liposomal preparations based on taxifolin complexes with variable valence metals on skin regeneration in case of chemical burns. *Tsitologiya = Cytology*, 2012, vol. 54, no. 3, pp. 251–260 (in Russian).
17. Shubina V. S., Shatalin Yu. V. Skin regeneration after a chemical burn in the presence of drugs based on taxifolin derivatives. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Cell technologies in biology and medicine*, 2012, no. 3, pp. 160–166 (in Russian).
18. Chernyakov A. V. Prevention and treatment of pathological scars in surgical practice. *Khirurgiya = Surgery*, 2017, no. 28, pp. 2063–2068 (in Russian).
19. Okur M. E., Şakul A. A., Ayla Ş., Karadağ A. E., Şenyüz C. Ş., Batur Ş. [et al.]. Wound healing effect of naringin gel in alloxan induced diabetic mice. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2020, vol. 44, no. 3, pp. 397–414. <https://doi.org/10.33483/jfpau.742224>
20. Lodhi S., Singhai A. K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2013, vol. 6, no. 4, pp. 253–259. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(13\)60053-x](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(13)60053-x)
21. Özay Y., Güzel S., Yumrutaş Ö., Pehlivanoglu B., Erdoğan I. H., Yildirim Z., Türk B. A., Darcan S. Wound healing effect of kaempferol in diabetic and nondiabetic rats. *Journal of Surgical Research*, 2019, vol. 233, pp. 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.08.009>
22. *Use of flavonoids in manufacturing compositions for wound healing. US 10376488 B2*. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/09/17/26/38b18e4fca1753/US10376488.pdf> (accessed 11.10.2021).
23. *Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides. WO2012/047763 A2*. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/d6/56/fa/a0aa6fa59f4816/WO2012047763A2.pdf> (accessed 11.10.2021).
24. Fes'kova E. V., Leont'ev V. N., Ignatovets O. S., Adamtsevich N. Yu., Besarab A. Yu. Extraction conditions and identification of flavonoids which stimulate tissue regeneration. *Trudy BGTU. Seriya 2: Khimicheskie tekhnologii, biotekhnologiya, geokologiya* [Proceedings of BSTU. Series 2. Chemical engineering, biotechnologies, geoecology], 2019, no. 1, pp. 49–53 (in Russian).
25. Adamtsevich N. Yu., Fes'kova E. V., Boltovskii V. S. Extraction of flavonoids from littlewale (*Lithospermum officinale* L.) and everlasting (*Helichrysum arenarium* L.). *Trudy BGTU. Seriya 2: Khimicheskie tekhnologii, biotekhnologiya, geokologiya* [Proceedings of BSTU. Series 2. Chemical engineering, biotechnologies, geoecology], 2020, no. 1, pp. 93–97 (in Russian).
26. Adamtsevich N. Yu., Fes'kova E. V., Boltovskii V. S., Titok V. V. Extraction of flavonoids from the leaves of the littlewale *Lithospermum officinale* L. (*Boraginaceae*) using microwave energy. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant], 2021, no. 1, pp. 85–92 (in Russian).
27. Adamtsevich N. Yu., Boltovsky V. S., Titok V. V. Extraction of flavonoids from epy flowers of the *Helichrysum arenarium* L. *Biotekhnologiya: vzglyad v budushchee: materialy 7 Mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii (Stavropol', 22–23 aprelya 2021 goda). Chast' 1* [Biotechnology: A Look into the Future: Proceedings of the 7th International scientific and technical conference (Stavropol, April 22–23, 2021). Part 1]. Stavropol, 2021, pp. 4–7 (in Russian).
28. Adamtsevich N. Yu., Boltovskii V. S., Titok V. V. The influence of extraction parameters on the output of flavonoids from littlewale (*Lithospermum officinale* L.). *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 402–411 (in Russian).
29. Kushina, I. V., Karpukhin M. Yu. Calendula is a popular medicinal and ornamental plant. *Agrarnoe obrazovanie i nauka = Agricultural education and science*, 2019, no. 3, pp. 12–17 (in Russian).
30. *Arrangement, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums). Sanitary rules and regulations 2.1.2.12-18-2006* (in Russian).
31. *Principles of Good Laboratory Practice. Interstate standard 33044-2014*. Moscow, Standartinfrom Publ., 2015. 12 p. (in Russian).

Информация об авторах

Адамцевич Наталья Юрьевна – ассистент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natallia.adamtsevich@mail.ru

Феськова Елена Владимировна – канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Information about the authors

Natallia Yu. Adamtsevich – Assistant. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natallia.adamtsevich@mail.ru

Alena V. Feskova – Ph. D. (Engineering), Senior Researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Леонтьев Виктор Николаевич – канд. хим. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leontiev@belstu.by

Жаворонок Ирина Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: iri8308@yandex.ru.

Ерофеева Анна-Мария Вадимовна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: amyerofeyeva@zoho.eu.

Маньковская Светлана Владимировна – канд. мед. наук, доцент, заместитель директора. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mankovskaya_svet@mail.ru

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, директор. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Viktor N. Leontiev – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leontiev@belstu.by

Irina P. Zhavoronok – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iri8308@yandex.ru

Anna-Maria V. Yerofeyeva – Junior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: amyerofeyeva@zoho.eu

Svetlana V. Mankovskaya – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Deputy Director. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mankovskaya_svet@mail.ru

Vladimir V. Titok – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 635.9:632
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-43-53>

Поступила в редакцию 08.09.2021
 Received 08.09.2021

Л. А. Головченко, И. К. Володько, Н. Г. Дишук, В. А. Тимофеева,
 С. О. Стахович, Я. В. Ковалев

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФИТОСАНИТАРНОЕ СОСТОЯНИЕ РАСТЕНИЙ РОДА *RHODODENDRON* L. КОЛЛЕКЦИОННОГО ФОНДА ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

Аннотация. Изучен современный состав комплекса возбудителей болезней и вредителей растений рода *Rhododendron* L. в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси в период 2012–2020 гг. и дана оценка степени поражения (повреждения) его видов и сортов наиболее распространенными патогенами и фитофагами.

Установлено, что в комплексе инфекционных болезней рододендрона доминируют мучнистая роса (*Erysiphe azaleae*), пятнистости листьев грибной этиологии (*Pestalotiopsis rhododendri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria* spp., *Sphaerulina azaleae*, *Phyllosticta concentrica*, *Phyllosticta rhododendricola*). Минорным компонентом являются некрозно-раковые (*Botryosphaeria dothidea*, *Cadophora* spp., *Hymenoscyphus* spp.), сосудистые болезни стволов и ветвей (*Fusarium oxysporum*), серая гниль (*Botrytis cinerea*), гниль бутонов (*Seifertia azaleae*), восковая болезнь (*Exobasidium rhododendri*). В коллекции не выявлено поражений растений бактериальным раком, фитофторозом, корневой гнилью, ржавчиной. Мучнистой росой были инфицированы исключительно листопадные рододендроны (26 таксонов), в наибольшей степени – *R. japonicum*, *R. japonicum* var. *aureum*, *R. roseum*, сорта Cecile, Move, Nabucco, Silver Slipper, Spek's Orange. Пятнистости листьев грибной этиологии выявлены на 31 виде и сорте рододендрона, наиболее сильно у сортов рододендрона кэтевбинского Calsar и гибридного Constanze. Изученный комплекс вредителей растений рододендрона включает 6 видов членистоногих-фитофагов – *Otiorynchus sulcatus*, *Phyllopertha horticola*, *Hemicrepidius niger*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Stephanitis rhododendri*, *Tetranychus urticae*. Преобладали листогрызущие вредители, повреждения которыми обнаружены на 75 видах и сортах рододендрона. Сосущие насекомые значительного вреда не наносили.

Ключевые слова: рододендрон, инфекционные и неинфекционные болезни, мучнистая роса, пятнистости листьев, сосущие и листогрызущие вредители, устойчивость к болезням и вредителям, ботанический сад, Беларусь

Для цитирования: Фитосанитарное состояние растений рода *Rhododendron* L. коллекционного фонда Центрального ботанического сада НАН Беларуси / Л. А. Головченко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 43–53. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-43-53>

Liudmila A. Golovchenko, Ivan K. Volodko, Natalia G. Dishuk, Veronika A. Timofeeva,
 Sofiya O. Stahovich, Yaroslav V. Kovalev

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

COMMON PROBLEMS OF *RHODODENDRON* L. IN THE CENTRAL BOTANICAL GARDEN OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

Abstract. Rhododendrons are some of the most attractive flowering shrubs in the landscape. The article presents the results of studying the common problems of Rhododendron collection in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, conducted in 2012–2020. There are several diseases and pests that commonly occur on rhododendrons every year. These include powdery mildew (*Erysiphe azaleae*), fungal leaf spots (*Pestalotiopsis rhododendri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria* spp., *Sphaerulina azaleae*, *Phyllosticta concentrica*, *Phyllosticta rhododendricola*), black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*), garden foliage beetle (*Phyllopertha horticola*), click beetle (*Hemicrepidius niger*), red spider mite (*Tetranychus urticae*), physiological leaf spots, oedema, winter injury, chlorosis. Less common on rhododendrons are stem diseases (*Botryosphaeria dothidea*, *Cadophora* spp., *Hymenoscyphus* spp.), wilt (*Fusarium oxysporum*), bud blight (*Seifertia azaleae*), leaf and flower gall (*Exobasidium rhododendri*), rhododendron lacebug (*Stephanitis rhododendri*), greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). There were identified that all evergreen and half evergreen rhododendrons have some resistance to powdery mildew, deciduous rhododendrons are more resistant to fungal leaf spots than evergreens. Damage to rhododendrons by insect pests usually does not cause significant harm but heavy feeding results in an unsightly plants.

Keywords: rhododendron, physiological diseases, plant pathogens, powdery mildew, fungal leaf spots, black vine weevil, garden foliage beetle, click beetle, spider mite, health status, resistance to pest and diseases, botanical garden, Belarus

For citation: Golovchenko L. A., Volodko I. K., Dishuk N. G., Timofeeva V. A., Stahovich S. O., Kovalev Ya. V. Common problems of *Rhododendron* L. in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 43–53 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-43-53>

Введение. Род Рододендрон (*Rhododendron* L.) относится к семейству Ericaceae Juss. Его представители, считающиеся высокодекоративными растениями из группы красивоцветущих кустарников, в последние десятилетия получают все большее распространение в практике отечественного декоративного садоводства. Дикорастущие виды рододендронов, которых более 1100, встречаются в регионах с холодным и умеренным климатом, в горах, на побережьях морей и океанов [1, 2]. На территории Беларуси в естественных условиях произрастает только один вид этого рода – рододендрон желтый (*Rhododendron luteum* L.), который является реликтом доледникового периода и занесен в Красную книгу Республики Беларусь [1, 3, 4].

Первые успешные посадки рододендронов в Центральном ботаническом саду (ЦБС) АН БССР осуществлены в начале 1950-х годов, целенаправленное формирование коллекции началось в 1966 г. [1]. В настоящее время это одна из наиболее крупных коллекций на территории стран СНГ (в коллекции зарегистрировано 67 видов и подвидов, 11 форм и 132 сорта). Возраст значительной части растений (до 40 %) – 35–40 лет, отдельные таксоны успешно культивируются уже более 50 лет [5–8]. При составлении комплексной оценки перспективности использования представителей рода Рододендрон в декоративном садоводстве Беларуси важное место отводится устойчивости их к болезням и вредителям.

В процессе интродукции растений из других районов и областей земного шара они вступают во взаимодействие с местными патогенами и фитофагами, а кроме того, существует реальная опасность заноса присущих им возбудителей болезней и вредителей, которые ранее не встречались в республике [1, 9]. Анализ литературных данных показал, что на рододендронах известно более 40 видов возбудителей болезней и вредителей [2, 10–23]. К наиболее распространенным болезням относят корневую гниль (*Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt., *P. cinnamomi* Rands, *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Calonectria morganii* Crous, Alfenas & M. J. Wingf., *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. и др.), отмирание побегов (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not., *Phomopsis* spp., *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld, *Diplodia rhododendri* Bellynek, *Cytospora sacculus* (Schwein.) Gvrit. и др.), мучнистую росу (*Erysiphe azaleae* (U. Braun) U. Braun & S. Takam., *Phyllactinia guttata* (Wallr.) Lév.), пятнистости листьев (*Ovulinia azalea* F. A. Weiss, *Sphaerulina azalea* (Voglino) Quaedvl., Verkley & Crous, *Phyllosticta concentrica* Sacc., *Phyllosticta rhododendricola* Brunaud., *Alternaria* spp., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Pestalotiopsis rhododendri* (D. Sacc.) Y. X. Chen и др.), восковую болезнь (*Exobasidium rhododendri* (Fuckel) C. E. Cramer, *E. vaccinii* (Fuckel) Woronin, *E. burtii* Zeller, *E. japonicum* Shirai), гниль бутонов (*Seifertia azaleae* (Peck) Partr. & Morgan-Jones.), серую гниль (*Botrytis cinerea* Pers.), ржавчину (*Chrysomyxa* spp., *Aecidium* spp., *Puccinia* spp.), сосудистые болезни стволов, ветвей и побегов (*Fusarium* spp., *Verticillium* spp.), бактериальный рак (*Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden, 1902) Young et al., 2001), вирусные болезни. Среди вредителей рододендрона в литературе наиболее часто упоминаются рододендроновый клоп (*Stephanitis rhododendri* Horváth, 1905), долгоносики (*Otiorynchus* Germar, 1822), червецы (*Pseudococcus cryptus* Hempel, 1918, *P. viburni* (Signoret, 1875)), белокрылки (*Odontoleyrodes rhododendri* (Takahashi, 1935), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856), тля (*Myzus persicae* (Sulzer, 1776) и др.), хрущик садовый (*Phyllopertha horticola* (L., 1758), щелкун черный (*Athous niger* L., 1758), клещи (*Tetranychus urticae* Koch, 1836, *Aculops* Keifer, 1966, *Phytonemus pallidus* (Banks, 1899), слизни (*Deroceras agreste* L., 1758) и др.

За все время существования коллекции рододендрона целенаправленного исследования ее фитосанитарного состояния не проводилось, а накопленные сведения о вредителях и болезнях были незначительны [1, 7, 24]. Все это обусловило необходимость организации мониторинга за динамикой развития возбудителей болезней и вредителей на коллекционных посадках рододендрона и научного обоснования мероприятий, направленных на контроль их фитосанитарного состояния.

Цель данного исследования – уточнить сведения о современном составе комплекса возбудителей болезней и вредителей рододендрона в коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси, оценить степень поражения (повреждения) видов и сортов наиболее распространенными патогенами и фитофагами.

Объекты и методы исследования. Материалом для исследования служили растения рода *Rhododendron* L., произрастающие на коллекционных участках, в питомнике, дендрарии и ландшафтной зоне ЦБС НАН Беларуси. В 2012–2018 гг. проводили периодическое, а в 2019–2020 гг. – детальное обследование представителей 144 таксонов рододендрона различного происхождения. Отбирали образцы растений с симптомами поражения болезнями и повреждения вредителями для дальнейшего уточнения видового состава патогенов и фитофагов в лабораторных условиях в соответствии с общепринятыми методиками [10, 11, 25, 26]. Таксономическое описание возбудителей болезней и вредителей растений дано в соответствии с актуальными данными интернет-порталов Index Fungorum и Fauna Europaea [27, 28].

Пораженность таксонов рододендрона болезнями (вредителями) оценивали по степени повреждения каждого экземпляра растения, после чего рассчитывали средний балл поражения вида, подвида сорта и т. д. Степень развития мучнистой росы определяли по шкале (в баллах): 0 – признаков поражения нет; 1 – на поверхности обнаружены мелкие единичные пятна мицелия гриба, занимающие до 10 % поверхности листа; 2 – налет занимает 11–25 % поверхности листа; 3 – налет занимает 26–50 % поверхности листа; 4 – мучнистый налет покрывает более 50 % поверхности листа, листья осыпаются. Степень развития пятнистостей листьев оценивали по шкале (в баллах): 0 – признаков поражения нет; 1 – на листе мелкие единичные пятна, поражено до 10 % поверхности листа; 2 – поражено 11–25 % поверхности листа; 3 – поражено 26–50 % поверхности листа, заметно плодоношение гриба; 4 – поражено более 50 % поверхности листа, наблюдается листопад. Численность живущих колониями сосущих вредителей определяли по шкале (в баллах): 0 – отсутствие вредителя; 1 – небольшие колонии на отдельных листьях, побегах; 2 – большие колонии на отдельных листьях, побегах; 3 – большие колонии на большинстве побегов или листьев. Степень повреждения растений грызущими вредителями оценивали по шкале (в баллах): 0 – отсутствие вредителя; 1 – слабое (повреждено до 25 % листьев, почек, побегов); 2 – среднее (повреждено до 50 % листьев, почек, побегов); 3 – сильное (повреждено свыше 50 % листьев, почек, побегов).

Результаты и их обсуждение. По результатам проведенного фитосанитарного мониторинга рододендронов коллекционного фонда установлено широкое распространение неинфекционных болезней и болезней грибной этиологии. Неинфекционные заболевания обусловлены воздействием неблагоприятных климатических факторов, почвенных условий, механических и химических повреждений, недостаточностью или избытком питательных веществ и др. Наиболее часто встречались:

хлороз (сначала листовая пластинка между жилками становится светло-зеленой, желтоватой, затем лист становится почти белым, развивается некроз краев листовых пластинок), который может быть обусловлен разными причинами: недостатком железа, магния, азота, калия, высоким содержанием кальция, застоем воды в зоне всасывающих корней;

солнечные ожоги (в конце зимы – начале весны на листьях и однолетних побегах образуются красновато-коричневые пятна разнообразных размеров);

чрезмерное иссыхание растений зимой (листья приобретают коричневую окраску, скручиваются вдоль срединной жилки и повисают вниз, верхушки побегов отмирают);

растрескивание коры ветвей и стволов и повреждение цветочных бутонов в осенне-зимний период;

деформация листьев и некроз верхушек побегов из-за позднеосенних заморозков;

оэдема, или водянка (на верхней стороне листовой пластинки образуются хлоротичные пятнышки, на нижней – опробковевающие бугорки, которые можно спутать со щитовкой), наблюдается, когда растение поглощает больше воды, чем может усвоить или выделить в процессе транспирации.

Неинфекционные болезни приводят к ослаблению растений, что ведет к снижению устойчивости к инфекционным болезням и вредителям. Поэтому чрезвычайно важно предотвращение прогрессирования неинфекционных болезней.

В результате изучения патогенной микобиоты растений рододендрона выявлены возбудители болезней – представители 13 родов грибов, в том числе относящихся к отделу Ascomycota,

классам Leotiomycetes (4), Sordariomycetes (3), Dothideomycetes (5), неясного систематического положения (1). Видовой состав возбудителей болезней рододендрона и симптомы поражения болезнями представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Т а б л и ц а 1. Видовой состав возбудителей болезней и вредителей растений рода *Rhododendron* L. в ЦБС НАН Беларуси

Table 1. List of common *Rhododendron* L. pests and diseases in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus

Болезнь (вредитель)	Симптомы поражения/повреждения	Вид
Мучнистая роса	Симптомы поражения варьируются в зависимости от сорта рододендрона: красно-коричневые пятна на верхней стороне листьев, либо буроватые зоны вдоль жилок листа, либо множество хлоротичных пятнышек. На одних сортах поверх пятен появляется белый мучнистый налет, на других его формирование не отмечено. Пораженные листья приобретают бурю окраску, преждевременно засыхают и опадают. В конце августа – начале сентября на нижней и верхней поверхности пораженных мучнистой росой листьев образуются плодовые тела возбудителя болезни (клейстотеции)	<i>Erysiphe azaleae</i> (U. Braun) U. Braun & S. Takam.
Антракноз	На листьях образуются крупные округлые пятна, на поверхности которых возникают многочисленные округлые плодовые тела гриба темного цвета. Пятна постепенно увеличиваются в размерах, листья усыхают. При высокой степени развития болезни могут поражаться стебли, которые затем также усыхают	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.
Песталоциевая пятнистость	Поражаются листья и стебли преимущественно ослабленных растений. На листьях, в основном по краям листовой пластинки, возникают пятна неправильной формы, серебристо-серые с верхней стороны, бурые с нижней стороны листьев. Пораженные листья желтеют и преждевременно засыхают. На стеблях пятна удлиненные, слегка вдавленные, серебристого цвета, со временем светлеют. В некротизированной ткани образуются спорангии гриба в виде подушечек сероватого цвета. Пораженные побеги постепенно засыхают	<i>Pestalotiopsis rhododendri</i> (D. Sacc.) Y. X. Chen
Альтернариозная пятнистость	На верхушках листьев образуются пятна рыжего цвета, которые постепенно увеличиваются в размере, вызывая краевые некрозы. При сильном развитии болезни пораженные листья усыхают	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl., <i>Alternaria</i> spp.
Септориозная пятнистость	На листьях образуются мелкие округлые пятна неправильной формы, красноватого, желтоватого, сероватого цвета, у которых к осени светлеет центральная часть. На поверхности пораженной ткани образуются пикниды черного цвета. Пораженные листья опадают	<i>Sphaerulina azaleae</i> (Vogling) Quaedvl.
Филлостиктозная пятнистость	На листьях образуются крупные бурые округлые пятна с красноватой каймой, мелкие пятна красного цвета с коричневой каймой. Некротизированные ткани высыхают и выпадают, оставляя в листьях дырки	<i>Phyllosticta concentrica</i> Sacc. <i>P. rhododendricola</i> Brunaud.
Серая гниль	На листьях, стеблях, бутонах, лепестках возникают расплывчатые бурые пятна без окаймления. На отдельных сортах весной отмечена высокая степень загнивания почек. При низкой влажности пораженные ткани засыхают и растрескиваются. При обилии влаги некротизированные ткани покрываются пушистым дымчато-серым налетом	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.
Гниль бутонов	Цветочные бутоны весной буреют, чернеют и не раскрываются, погибают. На их поверхности образуются многочисленные темно-коричневые, черные щетинки – органы спорангии возбудителя болезни	<i>Seifertia azaleae</i> (Peck) Partr. & Morgan-Jones
Трахеомикозное увядание	Возбудитель болезни через корни проникает в сосудистую систему и закупоривает ее, что приводит к потере тургора побегов, их побурению и засыханию. Листья засыхают и опадают. Крона изреживается. По коре распространяется серовато-белый мицелий гриба. Растение в итоге усыхает	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.
Ботриосфериевый рак	На коре пораженных побегов образуются темно-коричневые вдавленные участки, язвы, которые распространяются вдоль ветви. Кора отмирает и отслаивается. Листья повисают вниз, скручиваются, долго не опадают, побеги засыхают. В пораженных тканях образуются мелкие черные плодовые тела возбудителя болезни. На кусте отмирают отдельные ветви, остальные выглядят нормально	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug.) Ces. & De Not.

Окончание табл. 1

Болезнь (вредитель)	Симптомы поражения/повреждения	Вид
Коричневая гниль стволов	Отмечено растрескивание коры, ее отслоение, скручивание листьев на отдельных саженцах рододендрона, привезенных из зарубежных питомников. Растения засохли	<i>Cadophora</i> spp.
Некроз побегов	Отмечен некроз молодых побегов и почек на отдельных саженцах рододендрона, привезенных из зарубежных питомников. В некротизированной ткани массово образовались плодовые тела возбудителя болезни черного цвета. Пораженные побеги засохли	<i>Hymenoscyphus</i> spp.
Восковая болезнь	Молодые листья и бутоны видоизменяются в мясистые, подушкообразные наросты (галлы), изначально светло-зеленые. Постепенно на их поверхности развивается белый плотный восковидный налет спороношения грибов-возбудителей болезни. С течением времени галлы сморщиваются, приобретают коричневую окраску, засыхают. Болезнь выявлена только на отдельных саженцах, привезенных из зарубежных питомников	<i>Exobasidium rhododendri</i> (Fuckel) C. E. Cramer
Тепличная белокрылка	Поселяется на нижней стороне листьев, высасывая из них клеточный сок. На листьях появляются признаки мозаики, листья желтеют, деформируются, опадают. На выделяемой белокрылкой пади поселяются сажистые грибы (черный налет)	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood, 1856)
Рододендроновый клоп	Питается на нижней стороне листьев, где появляются черно-бурые точки, смолистые, засохшие. Верхняя сторона листьев – в множественных мелких хлоротичных точках (следы проколов). При сильном повреждении листья слегка скручиваются, засыхают и опадают	<i>Stephanitis rhododendri</i> Horváth, 1905
Бороздчатый долгоносик	Жуки объедают края листьев, в результате чего образуются характерные выеденные участки. Иногда грызут почки и кору молодых побегов, в результате чего побег выше поврежденного места засыхает. Взрослые особи питаются ночью, днем прячутся в почве, в соцветиях, поэтому их трудно заметить. Личинки обгрызают корни, что приводит к увяданию растений	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> (Fabricius, 1775)
Садовый хрущик	Жуки повреждают листья, молодые побеги, а личинки подгрызают корни	<i>Phyllopertha horticola</i> (Linnaeus, 1758)
Черный шелкун	Жуки питаются листьями и пыльцой. Личинки повреждают корни	<i>Hemicrepidius niger</i> (Linnaeus, 1758)
Обыкновенный паутинный клещ	Вредят в открытом и закрытом грунте. Заселяют молодые листья с нижней стороны, высасывают клеточный сок. Поврежденные листья желтеют, засыхают, преждевременно опадают	<i>Tetranychus urticae</i> Koch, 1836

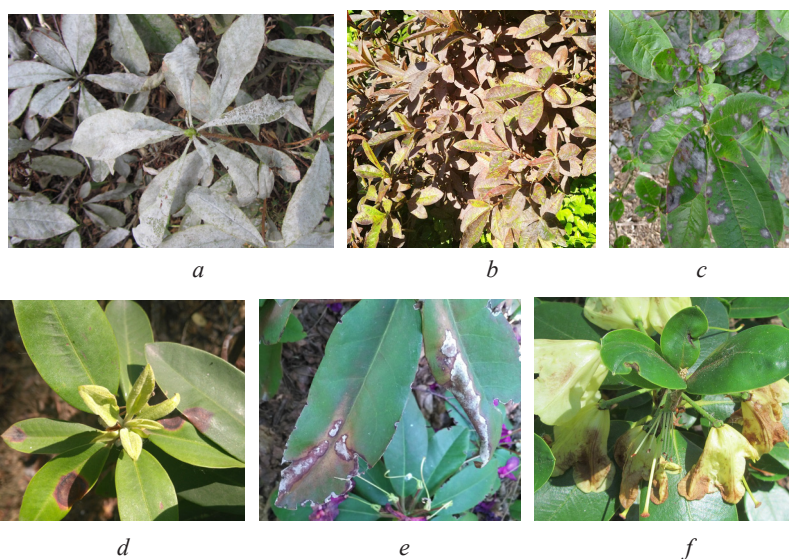


Рис. 1. Инфекционные болезни растений рододендрона: *a–c* – симптомы поражения мучнистой росой; *d* – антракноз; *e* – песталоциоз; *f* – серая гниль

Fig. 1. Fungal diseases of rhododendrons: *a–c* – *Erysiphe azaleae* on deciduous rhododendrons; *d* – *Colletotrichum* leaf spot; *e* – *Pestalotiopsis* leaf spot; *f* – *Botrytis* blight

Установлено, что в комплексе инфекционных болезней рододендрона доминируют мучнистая роса, пятнистости листьев грибной этиологии. Минорным компонентом являются некрозно-раковые, сосудистые болезни стволов и ветвей, серая гниль, гниль бутонов, восковая болезнь. Гниль корней, ржавчина, бактериальный рак, фитофтороз периодически встречаются на саженцах рододендрона, поступающих в ботанический сад из частных питомников и торговой сети. Пораженные растения выбраковываются и в коллекцию не попадают.

Оценка динамики развития болезней рододендрона в коллекционном фонде показала, что первые признаки поражения растений мучнистой росой появляются в июне (после цветения) на листопадных видах *R. japonicum*, *R. roseum* и *R. luteum*. Как правило, со второй-третьей декады июля распространенность и степень развития мучнистой росы в коллекционных насаждениях рододендрона возрастает. Сухая жаркая погода способствует очень быстрому распространению болезни, избыточное выпадение осадков в июле сдерживает распространение инфекции. Установлено, что в годы исследования мучнистой росой в той или иной степени поражалось 26 видов и сортов рододендрона (18,1 % от обследованных). Устойчивы к поражению мучнистой росой (ни на одном обследованном растении признаков болезни не обнаружено) 100 видов, форм и сортов вечнозеленых и полувечнозеленых рододендронов (69,4 % от обследованных) и 18 листопадных (12,5 %) (табл. 2). В наибольшей степени мучнистой росой поражались *R. japonicum*, *R. japonicum* var. *aureum*, *R. roseum* и сорта рододендрона гибридного Cecile, Move, Nabucco, Silver Slipper, Spek's Orange.

Т а б л и ц а 2. Пораженность мучнистой росой листопадных рододендронов коллекционного фонда ЦБС НАН Беларуси (2019–2020 гг.)

Table 2. Incidence of powdery mildew of deciduous rhododendrons from the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2019–2020)

Средняя степень поражения, баллы	Перечень видов и сортов
0	<i>R. calendulaceum</i> var. <i>aurantium</i> , <i>R. canadense</i> , <i>R. canadense</i> var. <i>albiflorum</i> , <i>R. canadense</i> var. <i>blue</i> , <i>R. flavum</i> , <i>R. kaempferi</i> , <i>R. molle</i> , <i>R. mucronulatum</i> , <i>R. occidentale</i> , <i>R. poukhanense</i> , <i>R. reticulatum</i> , <i>R. schlippenbachii</i> , <i>R. vaseyi</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Gibraltar, Goldtopas, Ledikanense, Sarina, Satshiko)
0,1–1	<i>R. albrechtii</i> , <i>R. prunifolium</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Fireball, Homebush, Klondyke, Persil)
1,1–2	<i>R. calendulaceum</i> , <i>R. luteum</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Juanita, Golden Flare, Goldpracht, Hotspur Red, Pollarzvaigzne)
2,1–3	<i>R. occidentale</i> cv. Irene Koster, <i>R. × hybridum</i> (cv. Anneke, Cannon Double, Golden Light, Lorija)
3,1–4	<i>R. japonicum</i> , <i>R. japonicum</i> var. <i>aureum</i> , <i>R. roseum</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Cecile, Move, Nabucco, Silver Slipper, Spek's Orange)

Пятнистости листьев грибной этиологии характеризуются образованием на листьях пятен различной формы, структуры, размеров и окраски. Пораженные ткани отмирают, в некоторых случаях на месте некроза ткань выпадает, образуются дырки. Поражение растений пятнистостями приводит к усыханию листьев, побегов, преждевременному листопаду, вследствие чего нарушаются физиологические процессы в растении, плохо закладываются цветочные почки, теряется декоративность. Установлено, что многие виды и сорта рододендрона в коллекции одновременно инфицированы разными видами грибов – возбудителей пятнистостей листьев. Первые симптомы болезней на молодых листьях появляются поздней весной. Пик развития болезни отмечается во второй половине лета. Пятнистости листьев грибной этиологии выявлены на 31 виде и сорте рододендрона (21,5 % от обследованных) (табл. 3).

Листопадные формы рододендронов оказались более устойчивы к поражению возбудителями пятнистостей листьев по сравнению с вечнозелеными и полувечнозелеными: болезни выявлены только на экземплярах *R. canadense*. Среди вечнозеленых и полувечнозеленых форм наиболее сильно пятнистостями поражались сорта рододендрона кэтевбинского Calsar и гибридного Constanze. Средняя степень поражения пятнистостями 28 таксонов рододендрона (19,4 % от обследованных) не превышала 1 балл.

Серая гниль, обнаруженная на 9 сортах и видах рододендрона (6,25 % от обследованных), значительного вреда не наносила. На листопадном виде *R. prunifolium* отмечено поражение листьев. На вечнозеленых и полувечнозеленых *R. catawbiense* cv. Bluetopia, Old Port, *R. fortunei*,

Т а б л и ц а 3. Пораженность пятнистостями листьев рододендронов коллекционного фонда ЦБС НАН Беларуси (2019–2020 гг.)

T a b l e 3. Incidence of fungal leaf spots of rhododendrons from the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2019–2020)

Средняя степень поражения, баллы	Перечень видов и сортов
0	Вечнозеленые и полувечнозеленые формы: <i>R. ambiguum</i> , <i>R. brachycarpum</i> , <i>R. brachycarpum</i> cv. Helsinki University, <i>R. carolinianum</i> , <i>R. catawbiense</i> (cv. Album Novum, Alfred, Bluetopia, Effner, Grandiflorum, Gomer Waterer, Humboldt, Lee's Dark Purple), <i>R. dauricum</i> cv. April Snow, <i>R. fauriei</i> var. <i>roseum</i> , <i>R. impeditum</i> , <i>R. insigne</i> cv. Brigitte, <i>R. fortune</i> cv. Scintillation, <i>R. ledebourii</i> , <i>R. micranthum</i> , <i>R. minus</i> cv. Ramapo, <i>R. obtusum</i> , <i>R. kiusianum</i> cv. Diamant Weiss, <i>R. ponticum</i> cv. Goldflimmer, <i>R. purdomii</i> , <i>R. sichotense</i> , <i>R. wardii</i> (cv. Brasilia, Lashsgold), <i>R. williamsianum</i> , <i>R. williamsianum</i> cv. Gartendirektor Glocker, <i>R. yakushmanum</i> (cv. Blurettia, Fantastica, Kalinka, Silbervolke, Schneewittchen), <i>R. × hybridum</i> (cv. Andris, Aquamarin, Babites compactas, Babuschka, Bad Eilsen, Bernstein, Cadis, Corinna, Doctor Rutgers, Flantand, Flava, Fluidum, Frederik d'Honey, Hachmans Charmant, Haaga, Jacksonii, Janka, Kazimiezz Odnowiciel, Krolowa Bona, Krolowa Jadwiga, Lavendula, M-m Masson, Madam Albert van Hecke, Pearce American Beauty, Peter Tigerstedt, P. J. M. Elite, Pohjola's Daughter, Polaris, Polarnacht, Princess Anne, Rectors, Scarlet Wonder, Stadt Westerstede, Taragona, Toms, Wilgens Ruby) Листопадные формы: <i>R. albrechtii</i> , <i>R. calendulaceum</i> , <i>R. calendulaceum</i> var. <i>aurantium</i> , <i>R. canadense</i> var. <i>albiflorum</i> , <i>R. canadense</i> var. <i>blue</i> , <i>R. flavum</i> , <i>R. japonicum</i> , <i>R. japonicum</i> var. <i>aureum</i> , <i>R. kaempferi</i> , <i>R. luteum</i> , <i>R. molle</i> , <i>R. mucronulatum</i> , <i>R. occidentale</i> , <i>R. occidentale</i> cv. Irene Koster, <i>R. poukhanense</i> , <i>R. prunifolium</i> , <i>R. reticulatum</i> , <i>R. roseum</i> , <i>R. schlippenbachii</i> , <i>R. vaseyi</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Anneke, Cannon Double, Cecile, Fireball, Gibraltar, Golden Light, Golden Flare, Goldpracht, Goldtopas, Homebush, Hotspur Red, Juanita, Klondyke, Ledikanense, Lorija, Move, Nabucco, Persil, Pollarzvaigzne, Sarina, Satshiko, Silver Slipper, Spek's Orange)
0,1–1	Вечнозеленые и полувечнозеленые формы: <i>R. catawbiense</i> , <i>R. catawbiense</i> (cv. Boursault, English Roseum, Old Port, Roseum Elegans), <i>R. dauricum</i> , <i>R. fargesii</i> , <i>R. fauriei</i> , <i>R. fortunei</i> , <i>R. hirsutum</i> , <i>R. keiskei</i> cv. Patty Bee, <i>R. maximum</i> , <i>R. ponticum</i> , <i>R. sanguineum</i> var. <i>haemaleum</i> , <i>R. smirnovii</i> , <i>R. wardii</i> cv. Goldbukket, <i>R. yakushmanum</i> cv. Lumina, <i>R. × hybridum</i> (cv. Anastasia, August Lamken, Azurro, Bengal, Berliner Liebe, Cheer, Cosmopolitan, Cunningham's White, Dr. H. C. Dresselhuys, Rasputin, Simona) Листопадные формы: <i>R. canadense</i>
1,1–2	–
2,1–3	Вечнозеленые и полувечнозеленые формы: <i>R. catawbiense</i> cv. Calsap, <i>R. × hybridum</i> cv. Constanze
3,1–4	–

R. minus, *R. sanguineum* var. *haemaleum*, *R. × hybridum* cv. Goldbukket, Nachmann's Charmant, Scarlet Wonder серая гниль поражала поврежденные весенними заморозками цветочные почки.

В насаждениях рододендрона отмечено повреждение растений грызущими и сосущими вредителями. Многие виды фитофагов ведут ночной образ жизни, что затрудняет их выявление и идентификацию. В период проведения данного исследования выявлено 6 видов членистоногих-фитофагов, относящихся к 6 семействам, 3 отрядам, 2 классам. Видовой состав вредителей рододендрона и симптомы повреждения приведены в табл. 1 и на рис. 2.



Рис. 2. Вредители рододендрона: *a* – колонии белокрылки на листьях рододендрона; *b* – повреждение листьев долгоносиками

Fig. 2. Insect pests of rhododendrons: *a* – whiteflies on rhododendron leaves; *b* – adult root weevil notching

Сосущие вредители представлены полужесткокрылыми насекомыми (белокрылкой *Trialeurodes vaporariorum* из семейства Aleyrodidae и клопом *Stephanitis rhododendri* из семейства Tingidae) и паутинным клещом *Tetranychus urticae* (семейство Tetranychidae). Тепличная белокрылка постоянно вредит сеянцам рододендрона в закрытом грунте. В открытом грунте белокрылку отмечали в мае–июне на листьях *R. fargesii*, *R. × hybridum* cv. Bengal, *R. wardii* cv. Brasilia, растущих рядом с оранжереями ботанического сада, из которых, возможно, она и перелетает. Значительного вреда в открытом грунте белокрылка не наносила. Рододендроновый клоп выявлен на отдельных экземплярах *R. catawbiense*, *R. fortunei* в ландшафтном парке, в коллекционном фонде не обнаружен. Обыкновенный паутинный клещ, который является опасным вредителем многих видов растений, регулярно причиняет значительный вред сеянцам рододендрона в теплице, а в жаркую сухую погоду способен наносить ущерб растениям и в открытом грунте (в 2019–2020 гг. выявлен на листьях *R. maximum* и *R. × hybridum* cv. Bernstein).

Грызущие вредители представлены жесткокрылыми насекомыми, среди которых наиболее часто встречается долгоносик-скосарь *Otiorhynchus sulcatus* из семейства Curculionidae. Гораздо реже встречаются хрущик садовый *Phyllopertha horticola* из семейства Scarabaeidae и щелкун *Hemicrepidius niger* из семейства Elateridae. Повреждение растений грызущими насекомыми выявлено на 75 видах и сортах рододендрона (52,1 % от обследованных) (табл. 4). Детальный учет степени повреждения листьев рододендрона грызущими насекомыми показал, что, несмотря на довольно широкое распространение этих вредителей в коллекции, в условиях 2019–2020 гг. существенного вреда они не наносили (средняя степень повреждения растений листьев не превышала 1 балла). Однако при наличии благоприятных для развития насекомых условий они могут наносить значительный ущерб, снижая декоративность и жизнеспособность растений.

Т а б л и ц а 4. Поврежденность грызущими насекомыми рододендронов коллекционного фонда ЦБС НАН Беларуси (2019–2020 гг.)

Table 4. Severity of pests damage on rhododendrons from the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2019–2020)

Средняя степень повреждения, баллы	Перечень видов и сортов
0	Вечнозеленые и полувечнозеленые формы: <i>R. brachycarpum</i> cv. Helsinki University, <i>R. dauricum</i> , <i>R. dauricum</i> cv. April Snow, <i>R. impeditum</i> , <i>R. fargesii</i> , <i>R. hirsutum</i> , <i>R. keiskei</i> cv. Patty Bee, <i>R. kiusianum</i> cv. Diamant Weiss, <i>R. ledebourii</i> , <i>R. micranthum</i> , <i>R. minus</i> cv. Ramapo, <i>R. obtusum</i> , <i>R. sichotense</i> , <i>R. yakushmanum</i> (cv. Blurettia, Fantastica, Lumina), <i>R. × hybridum</i> (cv. Anastasia, Azurro, Babites compactas, Babuschka, Bad Eilsen, Bengal, Bernstein, Cadis, Constanze, Cosmopolitan, Flantand, Flava, Hachmans Charmant, Janka, Krolowa Bona, Krolowa Jadwiga, Lavendula, M-m Masson, Madam Albert van Hecke, P. J. M. Elite, Polaris, Princess Anne, Rectors, Simona, Stadt Westerstede, Toms, Wilgens Ruby) Листопадные формы: <i>R. calendulaceum</i> var. <i>aurantium</i> , <i>R. canadense</i> , <i>R. canadense</i> var. <i>albiflorum</i> , <i>R. luteum</i> , <i>R. occidentale</i> cv. Irene Koster, <i>R. poukhanense</i> , <i>R. prunifolium</i> , <i>R. roseum</i> , <i>R. schlippenbachii</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Cannon Double, Cecile, Gibraltar, Golden Light, Golden Flare, Goldpracht, Goldtopas, Homebush, Hotspur Red, Klondyke, Ledikanense, Move, Nabucco, Persil, Sarina, Satshiko, Silver Slipper)
0,1–1	Вечнозеленые и полувечнозеленые формы: <i>R. ambiguum</i> , <i>R. brachycarpum</i> , <i>R. carolinianum</i> , <i>R. catawbiense</i> , <i>R. catawbiense</i> (cv. Album Novum, Alfred, Bluetopia, Boursault, Calsap, Effner, English Roseum, Grandiflorum, Gomer Waterer, Humbold, Lee's Dark Purple, Old Port, Roseum Elegans), <i>R. fauriei</i> , <i>R. fauriei</i> var. <i>roseum</i> , <i>R. fortunei</i> , <i>R. fortune</i> cv. Scintillation, <i>R. insigne</i> cv. Brigitte, <i>R. maximum</i> , <i>R. ponticum</i> , <i>R. ponticum</i> cv. Goldflimmer, <i>R. purdomii</i> , <i>R. sanguineum</i> var. <i>haemaleum</i> , <i>R. smirnovii</i> , <i>R. wardii</i> (cv. Brasilia, Goldbukket, Lashsgold), <i>R. williamsianum</i> , <i>R. williamsianum</i> cv. Gartendirector Glocker, <i>R. yakushmanum</i> (cv. Kalinka, Silbervolke, Schneewittchen), <i>R. × hybridum</i> (cv. Andris, Aquamarin, August Lamken, Berliner Liebe, Cheer, Corinna, Cunningham's White, Doctor Rutgers, Fluidum, Dr. H. C. Dresselhuys, Frederik d'Honey, Haaga, Jacksonii, Kazimiezz Odnowiciel, Pearce American Beauty, Peter Tigerstedt, Pohjola's Daughter, Polarnacht, Rasputin, Scarlet Wonder, Taragona) Листопадные формы: <i>R. albrechtii</i> , <i>R. calendulaceum</i> , <i>R. canadense</i> var. <i>blue</i> , <i>R. flavum</i> , <i>R. japonicum</i> , <i>R. japonicum</i> var. <i>aureum</i> , <i>R. kaempferi</i> , <i>R. molle</i> , <i>R. mucronulatum</i> , <i>R. occidentale</i> , <i>R. reticulatum</i> , <i>R. vaseyi</i> , <i>R. × hybridum</i> (cv. Anneke, Fireball, Juanita, Lorida, Pollarzvaigzne, Spek's Orange)
1,1–2	–
2,1–3	–
3,1–4	–

Заклученне. В результате проведенного исследования уточнен видовой состав и структура доминирования возбудителей болезней и вредителей растений рододендрона в насаждениях ЦБС НАН Беларуси. Установлено, что в комплексе инфекционных болезней растений рододендрона в насаждениях ЦБС доминируют мучнистая роса (*E. azaleae*), пятнистости листьев грибной этиологии (*P. rhododendri*, *C. gloeosporioides*, *Alternaria* spp., *S. azaleae*, *P. concentrica*, *P. rhododendricola*). Минорным компонентом являются некрозно-раковые (*B. dothidea*, *Cadophora* spp., *Hymenoscyphus* spp.), сосудистые болезни стволов и ветвей (*F. oxysporum*), серая гниль (*B. cinerea*), гниль бутонов (*S. azaleae*), восковая болезнь (*E. rhododendri*). В коллекции не выявлено поражений растений бактериальным раком, фитофторозом, корневой гнилью, ржавчиной.

В условиях вегетационных сезонов 2019–2020 гг. мучнистой росой было поражено 26 таксонов рододендрона, причем наиболее сильно страдали *R. japonicum*, *R. japonicum* var. *aureum*, *R. roseum* и сорта рододендрона гибридного Cecile, Move, Nabucco, Silver Slipper, Spek's Orange. Не было поражено 100 видов, форм и сортов вечнозеленых и полувечнозеленых рододендронов и 18 листопадных. Пятнистости листьев грибной этиологии выявлены на 31 виде и сорте рододендрона, в том числе всего на одном листопадном (*R. canadense*). Наиболее сильно пятнистостями поражились сорта рододендрона кэтевбинского Calsap и гибридного Constanze.

Изученный комплекс вредителей растений рододендрона включает 6 видов членистоногих-фитофагов – *O. sulcatus*, *P. horticola*, *H. niger*, *T. vaporariorum*, *S. rhododendri*, *T. urticae*. Преобладали листогрызущие вредители, повреждения которыми обнаружены на 75 видах и сортах рододендрона. Сосущие насекомые в условиях вегетационных сезонов 2019–2020 гг. значительного вреда не наносили.

Список использованных источников

1. Ботяновский, И. Е. Культура рододендронов в Белоруссии / И. Е. Ботяновский. – Минск : Наука и техника, 1981. – 96 с.
2. Александрова, М. С. Рододендроны природной флоры СССР / М. С. Александрова. – М. : Наука, 1975. – 112 с.
3. Определитель высших растений Беларуси : учеб. пособие для студентов биологических специальностей высших учебных заведений / Т. А. Сауткина [и др.] ; ред. В. И. Парфенов. – Минск : Дизайн ПРО, 1999. – 471 с.
4. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол. : И. М. Качановский (предс.) [и др.]. – Изд. 4-е. – Минск : Беларус. энцыкл., 2015. – 448 с.
5. Володько, И. К. Результаты интродукционных испытаний сортов рододендрона в условиях Беларуси / И. К. Володько, В. Л. Филипеня, Ж. Д. Альферович // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры : материалы Междунар. конф., посвящ. 80-летию Центр. бот. сада НАН Беларуси, Минск, 19–22 июня 2012 г. : в 2 ч. / редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 1. – С. 50–54.
6. Коллекция рода *Rhododendron* L. Центрального ботанического сада НАН Беларуси: история формирования, изучение, перспективы развития и использования / И. К. Володько [и др.] // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов : материалы III Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию со дня рожд. акад. Н. В. Смольского, Минск, 7–9 октября 2015 г. : в 2 ч. / редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2015. – Ч. 1. – С. 303–307.
7. Володько, И. К. Эколого-биологические основы интродукции рододендронов (*Rhododendron* L.) в условиях Беларуси / И. К. Володько, Ж. А. Рупасова, В. В. Титок ; под ред. В. И. Парфенова. – Минск, 2015. – 269 с.
8. Володько, И. К. Рододендроны в коллекциях Центрального ботанического сада НАН Беларуси и перспективы их использования в озеленении Беларуси / И. К. Володько, Ж. Д. Альферович // Состояние и перспективы развития зеленого строительства в Республике Беларусь : тез. Респ. науч.-практ. семинара, Минск, 26–27 апр. 2018 г. / редкол. : В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2018. – С. 62–65.
9. Жуков, А. М. Опасные малоизученные болезни хвойных пород в лесах России / А. М. Жуков, Ю. И. Гниненко. – Изд. 2-е, испр. и доп. – Пушкино : ВНИИЛМ, 2013. – 103 с.
10. Вредители и болезни цветочно-декоративных растений / Ю. В. Синадский [и др.] ; под ред. Ю. В. Синадского. – М. : Наука, 1982. – 592 с.
11. Трейвас, Л. Ю. Болезни и вредители декоративных садовых растений: Атлас-определитель / Л. Ю. Трейвас. – М. : Фитон+, 2007. – 192 с.
12. Ковальчук, В. А. Энтомо-фитопатологическое состояние коллекции растений рода *Rhododendron* в Ботаническом саду имени акад. А. В. Фомина Киевского национального университета имени Тараса Шевченко / В. А. Ковальчук, П. Я. Чумак // Науч. ведомости. Сер. Естеств. науки. – 2014. – № 3 (174), вып. 26. – С. 39–42.
13. Егорова, Л. Н. Микобиота декоративных растений рода *Rhododendron* в условиях интродукции на юге Приморского края / Л. Н. Егорова, Н. А. Павлюк, И. М. Кокшеева // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 308–312.

14. How to identify rhododendron and azalea problems [Electronic resource] // Washington State University Extension Bulletin. – N 1229. – 32 p. – Mode of access : <https://www.se-ars.org/uploads/3/9/7/2/39727246/eb1229.pdf>. – Date of access : 12.04.2021.
15. Nagao, H. Three species of *Exobasidium* causing Exobasidium leaf blight on subgenus *Hymenanthes*, *Rhododendron* spp., in Japan / H. Nagao, T. Sato, M. Kakishima // Mycoscience. – 2004. – Vol. 45, N 2. – P. 85–95. <https://doi.org/10.1007/s10267-003-0162-8>
16. Azalea and rhododendron diseases [Electronic resource]. – PennState Extension, 2016. – Mode of access: <https://extension.psu.edu/azalea-and-rhododendron-diseases>. – Date of access: 12.04.2021.
17. Barta, M. *Stephanitis takeyai* and *S. rhododendri* (Heteroptera: Tingidae) in Slovakia: first record and economic importance / M. Barta, T. Bibeň // J. Plant Protect. Res. – 2016. – Vol. 56, N 2. – P. 193–198. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0022>
18. Azalea & rhododendron diseases [Electronic resource] // The Clemson University Cooperative Extension Service. – 2019. – Mode of access: <https://hgic.clemson.edu/factsheet/azalea-rhododendron-diseases/>. – Date of access: 12.04.2021.
19. Douglas, S. M. Common problems of rhododendron and azalea [Electronic resource] / S. M. Douglas // Connecticut Agricultural Experiment Station. – URL: <https://portal.ct.gov/caes> (дата обращения: 15.04.2021).
20. Powdery mildew on *Rhododendron* caused by *Erysiphe azaleae* in Latvia / I. Apine [et al.] // Czech Mycol. – 2013. – Vol. 65, N 1. – P. 113–123.
21. First record of *Exobasidium rhododendri* (Fuckel) C. E. Cramer in Poland / W. Pusz [et al.] // Acta Soc. Bot. Pol. – 2019. – Vol. 88, N 3. – P. 3632. <https://doi.org/10.5586/asbp.3632>
22. Heluta, V. P. *Erysiphe azaleae*, a new powdery mildew fungus introduced into Turkey / V. P. Heluta, I. Akata, Ş. Kabaktepe // Biol. Divers. Conserv. – 2017. – Vol. 10/1. – P. 79–83.
23. Ochrona roślin wrzoso-watych / G. Łabanowski [et al.]. – Krakow : Wydawnictwo Plantpress Sp. Zo.o., 2001. – 113 p.
24. Злотников, А. К. Вирусное заболевание рододендрона (*Rhododendron* L.) / А. К. Злотников, Н. В. Войнило // Ботанические сады: состояние и перспективы сохранения, изучения, использования биологического разнообразия растительного мира: тез. докл. Междунар. науч. конф., посвящ. 70-летию со дня основания ЦБС, Минск, 30–31 мая 2002 г. / В. Н. Решетников [и др.]. – Минск, 2002. – С. 101–102.
25. Методы экспериментальной микологии : справочник / И. А. Дудка [и др.] ; отв. ред. В. И. Билай. – Киев : Наук. думка, 1982. – 550 с.
26. Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / И. Беттхер [и др.] ; пер. с нем. К. В. Попковой, В. А. Шмыгли. – М. : Агропромиздат, 1987. – 224 с.
27. Index Fungorum [Electronic resource]. – Mode of access : <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. – Date of access : 04.05.2021.
28. The Fauna Europaea [Electronic resource] // The European Commission, 2011. – Mode of access: <http://www.faunaeur.org>. Date of access: 05.05.2021.

References

1. Botyanovskii I. E. *Rhododendrons in Belarus*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1981. 96 p. (in Russian).
2. Aleksandrova M. S. *Rhododendrons of the natural flora of the USSR*. Moscow, Nauka Publ., 1975. 112 p. (in Russian).
3. Parfenov V. I. (ed.) *Manual for the identification of higher plant of Belarus*. Minsk, Dizain PRO Publ., 1999. 471 p. (in Russian).
4. Kachanovskii I. M. (ed.) *Belarus Red Data Book: List of Threatened Plants*. Minsk, Belaruskaya entsyklapedyya Publ., 2015. 448 p. (in Russian).
5. Volod'ko I. K., Filipenya V. L., Al'ferovich Zh. D. The results of rhododendron cultivars introduction tests in Belarus. *Introduktsiya, sokhranenie i ispol'zovanie biologicheskogo raznoobraziya mirovoi flory: materialy Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 80-letiyu Tsentral'nogo botanicheskogo sada Natsional'noi akademii nauk Belarusi (19–22 iyunya 2012, Minsk)*. *Chast' 1* [Introduction, conservation and use of biological diversity of the world's flora: materials of the International conference dedicated to the 80th anniversary of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (June 19–22, 2012, Minsk). Part 1]. Minsk, 2012, pp. 50–54 (in Russian).
6. Volod'ko I. K., Rupasova Zh. A., Rudevich M. N., Kutas E. N., Filipenya V. L., Goncharova L. V. Rhododendron collection of The Central Botanical Garden of National Academy of Sciences of Belarus: a history of the foundation, studies and perspectives of development and use. *Problemy sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya i ispol'zovaniya biologicheskikh resursov: materialy 3 Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 110-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N. V. Smol'skogo (7–9 oktyabrya 2015, Minsk)*. *Chast' 1* [Problems of biodiversity conservation and use of biological resources: materials of the 3rd International conference dedicated to the 110th anniversary of the birth of Academician N. V. Smol'sky (October 7–9, 2015, Minsk). Part 1]. Minsk, 2007, pp. 303–307 (in Russian).
7. Volod'ko I. K., Rupasova Zh. A., Titok V. V. *Ecological and biological bases of the introduction of rhododendrons in a climate of Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2015. 269 p. (in Russian).
8. Volod'ko I. K., Al'ferovich Zh. D. Rhododendron collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus and prospects of their use for landscaping in Belarus. *Sostoyanie i perspektivy razvitiya zelenogo stroitel'stva v Respublike Belarus': tezisy Respublikanskogo nauchno-prakticheskogo seminar (Minsk, 26–27 aprelya 2018 goda)* [State and prospects for the development of green building in the Republic of Belarus: abstracts of the Republican scientific and practical seminar (Minsk, April 26–27, 2018)]. Minsk, 2018, pp. 62–65 (in Russian).
9. Zhukov A. M., Gninenko Yu. I. *Hazardous understudied coniferous diseases in Russian forests. 2nd ed.* Pushkino, All-Russian Research Institute of Forestry and Forestry Mechanization, 2013. 103 p. (in Russian).
10. Sinadskii Yu. V., Korneeva I. T., Dobrochinskaya I. B., Efremova V. A., Drozdovskaya L. S., Kozarzhevskaya E. F., Matveeva M. A., Kovtunen V. F., Prokof'eva G. N. *Pests and diseases of ornamental plants*. Moscow, Nauka Publ., 1982. 592 p. (in Russian).

11. Treivas L. Yu. *Pests and diseases of garden plants*. Moscow, Fiton+ Publ., 2007. 192 p. (in Russian).
12. Koval'chuk V. P., Chumak P. Ya. Entomo-phytopathological state of collection of plants of the genus *Rhododendron* in the A. V. Fomin botanical garden. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki* [Scientific bulletin of Belgorod State University. Series Natural Sciences], 2014, no. 3 (174), pp. 39–42 (in Russian).
13. Egorova L. N., Pavlyuk N. A., Koksheeva I. M. Mycobiota of ornamental plants from the genus *Rhododendron* introduced to the south of Primorskiy region. *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and phytopathology], 2008, vol. 42, no. 2, pp. 308–312 (in Russian).
14. How to identify rhododendron and azalea problems. *Washington State University Extension Bulletin*, no. 1229. 32 p. Available at: <https://www.se-ars.org/uploads/3/9/7/2/39727246/eb1229.pdf> (accessed 12.04.2021).
15. Nagao H., Sato T., Kakishima M. Three species of *Exobasidium* causing *Exobasidium* leaf blight on subgenus *Hymenanthes*, *Rhododendron* spp., in Japan. *Mycoscience*, 2004, vol. 45, no. 2, pp. 85–95. <https://doi.org/10.1007/s10267-003-0162-8>
16. *Azalea and rhododendron diseases (2016)*. Available at: <https://extension.psu.edu/azalea-and-rhododendron-diseases> (accessed 12.04.2021).
17. Barta M., Bibeň T. *Stephanitis takeyai* and *S. rhododendri* (Heteroptera: Tingidae) in Slovakia: first record and economic importance. *Journal of Plant Protection Research*, 2016, vol. 56, no. 2, pp. 193–198. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0022>
18. Azalea & rhododendron diseases (2019). *The Clemson University Cooperative Extension Service*. Available at: <https://hgic.clemson.edu/factsheet/azalea-rhododendron-diseases/> (accessed 12.04.2021).
19. Douglas S. M. Common problems of rhododendron and azalea. *Connecticut Agricultural Experiment Station*. Available at: <https://portal.ct.gov/caes> (accessed 15.04.2021).
20. Apine I., Bankina B., Nikolajeva V., Tomsone S. Powdery mildew on *Rhododendron* caused by *Erysiphe azaleae* in Latvia. *Czech Mycology*, 2013, vol. 65, no. 1, pp. 113–123.
21. Pusz W., Malicki M., Patejuk K., Ronikier M., Suchan T. First record of *Exobasidium rhododendri* (Fuckel) C. E. Cramer in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2019, vol. 88, no. 3, p. 3632. <https://doi.org/10.5586/asbp.3632>
22. Heluta V. P., Akata I., Kabaktepe Ş. *Erysiphe azaleae*, a new powdery mildew fungus introduced into Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 2017, vol. 10, no. 1, pp. 79–83.
23. Łabanowski G., Orlikowski L., Soika G., Wojdyła A., Korbin M. *Ochrona roślin wrzosowatych*. Krakow, Wydawnictwo Plantpress Sp. Zo. o., 2001. 113 p.
24. Zlotnikov A. K., Voinilo N. V. Rhododendron viral disease. *Botanicheskie sady: sostoyanie i perspektivy sokhraneniya, izucheniya, ispol'zovaniya biologicheskogo raznoobraziya rastitel'nogo mira: tezisy dokladov Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Minsk, 30–31 maya 2002)* [Botanical gardens: state and prospects of conservation, study, use of biological diversity of the plant world: abstracts of the International scientific conference (Minsk, May 30–31, 2002)]. Minsk, 2002, pp. 101–102 (in Russian).
25. Bilai V. I. (ed.). *Guide of the experimental mycology methods*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1982. 550 p. (in Russian).
26. Bettkher I., Vetsel' T., Dreve F. V., Kegler X., Naumann K., Fraier B., Frauenshtain K., Fuks E. *Methods for determination of pests and diseases of agricultural plants*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1987. 224 p. (in Russian).
27. *Index Fungorum*. Available at: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (accessed 04.05.2021).
28. The Fauna Europaea (2011). *The European Commission*. Available at: <http://www.faunaeur.org> (accessed 05.05.2021).

Информация об авторах

Головченко Людмила Анатольевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: l.golovchenko@cbg.org.by

Володько Иван Казимирович – канд. биол. наук, заместитель директора по научной работе. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: i.volodko@cbg.org.by

Дишук Наталия Георгиевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dishukn@rambler.ru

Тимофеева Вероника Алексеевна – канд. с.-х. наук, вед. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.a.timofeeva@mail.ru

Стахович Софья Османовна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Ковалев Ярослав Вячеславович – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslav.kovalev.1998@mail.ru

Information about the authors

Liudmila A. Golovchenko – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: l.golovchenko@cbg.org.by

Ivan K. Volodko – Ph. D. (Biol.), Deputy Director for Science. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: i.volodko@cbg.org.by

Natalia G. Dishuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dishukn@rambler.ru

Veronika A. Timofeeva – Ph. D. (Agric.), Leading Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v.a.timofeeva@mail.ru

Sofija O. Stahovich – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Yaroslav V. Kovalev – Junior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslav.kovalev.1998@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 729.22
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65>

Поступила в редакцию 11.11.2021
Received 11.11.2021

Н. И. Наумович, З. М. Алешенкова, И. Н. Ананьева, Г. В. Сафронова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, УСТОЙЧИВЫХ К ЗАСОЛЕНИЮ ПОЧВ

Аннотация. Из образцов почвы, отобранной в районе Старобинского месторождения калийных солей (ОАО «Беларуськалий»), было выделено 315 изолятов солеустойчивых бактерий, в том числе азотфиксирующий СА-6 и фосфатсолюбилизирующий Ср-1, способные переносить абиотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрациях 1710 и 2565 мМ соответственно, и дефицит влаги при водном потенциале $-0,20$ и $-0,42$ МПа. Изолят Ср-1 способен солюбилизовать фосфаты с образованием зон «гало» 9 мм, а изолят СА-6 обладает нитрогеназной активностью 44,0 нМ C_2H_2 /фл/3 сут. Изоляты Ср-1 и СА-6 являются ростстимулирующими микроорганизмами, что обусловлено их способностью синтезировать индоллил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрациях 89,7 и 37,8 мкг ИУК/мл культуральной жидкости соответственно. Отобранные солеустойчивые изоляты были идентифицированы на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и MALDI-TOF масс-спектрометрии и отнесены к видам *Rhodococcus jostii* и *Priestia megaterium*. Солеустойчивые штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-1314Д и БИМ В-1353Д соответственно.

Ключевые слова: солеустойчивость, азотфиксация, фосфатсолюбилизация, ростстимуляция, идентификация

Для цитирования: Выделение и идентификация микроорганизмов, устойчивых к засолению почв / Н. И. Наумович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 54–65. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65>

Nadezhda I. Naumovich, Zinaida M. Aleschenkova, Irina N. Ananyeva, Halina V. Safronava

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISM'S RESISTANT TO SOIL SALINIZATION

Abstract. 315 variants of halotolerant bacteria were isolated from soil samples taken around Starobin potash deposit mined by Belaruskali concern. Nitrogen-fixing isolate CA-6 and phosphate-solubilizing isolate Cp-1 capable to withstand abiotic stress caused by sodium chloride in concentration 1710 and 2565 mM, respectively and water deficiency characterized by osmotic potential -0.20 and -0.42 MPa were sorted out. Isolate Cp-1 may dissolve phosphates yielding halo zones 9 mm in diameter while isolate CA-6 displays nitrogenase activity 44.0 nM C_2H_2 /vial/3 days. Both isolates are growth-promoting organisms, distinguished by the ability to synthesize IAA in concentrations 89.7 and 37.8 μ g IAA/ml of cultural liquid, respectively. The selected salt-resistant isolates were identified based on analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene and data of MALDI-TOF mass spectrometry and were referred to the species *Rhodococcus jostii* and *Priestia megaterium*. Halotolerant strains *Priestia megaterium* Cp-1 and *Rhodococcus jostii* CA-6 were deposited in Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms under the respective registration numbers BIM B-1314D and BIM B-1353D.

Keywords: salt resistance, nitrogen fixation, phosphate solubilization, growth stimulation, identification

For citation: Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V. Isolation and identification of microorganism's resistant to soil salinization. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 54–65 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-54-65>

Введение. Гиперсоленые экосистемы – один из экстремальных видов экосистем, где могут существовать только организмы с комплексными адаптированными метаболическими механизмами снижения внутриклеточного осмотического давления. Известно, что адаптация почвенных микроорганизмов к экстремальным условиям, в том числе к условиям засоления, повышается при вступлении в симбиотические взаимоотношения с растениями [1].

В связи с этим особый интерес для исследователей во всем мире представляют галофильные и галотолерантные микроорганизмы, разнообразие которых в природе, экологическая роль и метаболизм изучены недостаточно. Исследование солеустойчивых ростстимулирующих микроор-

ганизмов показывает их огромный потенциал для минимизации негативного влияния засоления и биоремедиации засоленных почв. Солеустойчивые почвенные и ризосферные микроорганизмы являются биологически значимой частью почвообразовательных процессов и фитосанитарного состояния почвы, а также питания растений. Они обладают практически неограниченными возможностями, оказывая влияние на любые природные и неприродные соединения, способны трансформировать органические и неорганические вещества и изменять их химический состав, что приводит к обогащению почвы макро- и микроэлементами и восстановлению почвенного плодородия [2].

В связи с этим поиск солеустойчивых микроорганизмов, обладающих комплексом полезных свойств, таких как азотфиксация, фосфатмобилизация и ростстимуляция, и перспективных для создания биопрепаратов, стимулирующих рост и развитие растений в условиях абиотического стресса, является актуальным [3].

Цель работы – выделение, отбор и идентификация солеустойчивых штаммов микроорганизмов, обладающих комплексом полезных свойств.

Материалы и методы исследования. Солеустойчивые микроорганизмы из образцов почвы, отобранных на территории ОАО «Беларуськалий», выделяли из накопительных культур путем поверхностного посева почвенной суспензии на среду LB [4], содержащую хлорид натрия в концентрации 3 %. Для адаптивной селекции отобранных бактериальных культур осуществляли их последовательные пересевы на агаризованную среду LB, содержащую хлорид натрия в концентрациях 3 % (513 мМ), 5 % (855 мМ), 7 % (1197 мМ), 10 % (1710 мМ), 12 % (2052 мМ), 15 % (2565 мМ), методом истощающегося штриха [5]. Выделение и учет численности азотфиксирующих бактерий проводили на безазотистых средах Эшби и Бёрка [6], фосфатмобилизующих – на глюкозо-аспарагиновой среде с осажденными фосфатами кальция [7]. Значения эффективности солубилизации фосфатов кальция и индекс солубилизации рассчитывали согласно [8, 9]. Нитрогеназную активность чистых культур солеустойчивых олигонитрофильных изолятов определяли ацетиленовым методом, используя газовый хроматограф «Хромос ГХ-1000» [10]. Количество индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной жидкости определяли колориметрическим методом [11]. Ростстимулирующее действие солеустойчивых бактериальных изолятов на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного изучали с помощью методов, изложенных в работе [12]. Влияние NaCl и полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ-6000) на рост отобранных штаммов на жидких средах изучали в лабораторных условиях, используя колбы Эрленмейра объемом 250 мл со 100 мл питательной среды LB с 7, 10 и 12 % NaCl или 3 % (–0,20 МПа), 5 % (–0,42 МПа), 15 % (–1,31 МПа) ПЭГ-6000 [13, 14]. Исследуемые образцы культивировали в течение 72 ч, а затем высевали на поверхность агаризованной среды LB.

Для выделения геномной ДНК использовали набор реактивов Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience, Германия) согласно прилагаемой инструкции. Наличие *nifH* гена у микроорганизмов определяли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя праймеры *nifH-1F* и *nifH-1R* с параметрами амплификации, приведенными в работе [15]. Видовую принадлежность бактерий устанавливали на основании данных сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, амплификацию которого проводили методом ПЦР с универсальными праймерами 8f и 1492r (режим ПЦР указан в работе [16]). Детекцию ПЦР-продукта осуществляли в горизонтальном 1,5 %-ном агарозном геле в 1×TAE буфере с бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Для определения размеров фрагмента генов *nifH* и 16S рРНК использовали маркеры молекулярного веса O'GeneRuler™ 100 bp и O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermetas, Литва) соответственно. Секвенирование переменных участков гена, кодирующих 16S рРНК, осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реактивов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience, Германия) и меченого Cy5.5 праймера 926r (ОДО «Праймтех»). Продукты секвенирующей реакции детектировали, используя автоматический секвенатор 4300 DNA Analyzer (Li-COR Biosciences, США). Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью компьютерных программ eSeq V.3.1.10 (Li-COR Biosciences, США), а сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей из базы данных GenBank – с использованием компьютерной программы BLAST (<http://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/ blast) и базы данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Филогенетическое дерево было построено с помощью программы MEGA-X (методом «присоединения соседей») и по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. Идентификацию солеустойчивых бактериальных изолятов осуществляли методом масс-спектрометрии на Microflex LRF system (Bruker Daltonic GmbH, Германия).

Результаты и их обсуждение. Из накопительных культур образцов почвы, отобранных на территории ОАО «Беларуськалий», методом посева на твердую питательную среду LB, содержащую хлорид натрия в концентрации 3 %, было выделено 315 бактериальных морфотипов, среди которых путем последовательного пересева на среду LB, содержащую хлорид натрия в концентрациях 513, 855, 1197, 1710, 2052 и 2565 мМ, был проведен скрининг на наибольшую солеустойчивость микроорганизмов (табл. 1).

Таблица 1. Адаптивная селекция солеустойчивых бактериальных изолятов, выделенных из засоленной почвы и почвы с дефицитом влаги, на среде LB в присутствии хлорида натрия

Table 1. Adaptive selection of halotolerant bacterial isolates isolated from saline soils and water deficiency soils on LB medium in presence of sodium chloride

Изолят	Рост на агаризованной среде						
	Контроль	LB + 513 мМ NaCl	LB + 855 мМ NaCl	LB + 1197 мМ NaCl	LB + 1710 мМ NaCl	LB + 2052 мМ NaCl	LB + 2565 мМ NaCl
Со-2	+++	+++	++	++	++	+	–
Со-3	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
Со-5	+++	+++	++	+	–	–	–
Со-6	+++	+++	+++	+++	++	+	–
Со-7	+++	+++	+++	+++	+	–	–
Со-8	+++	+++	+++	++	+	+	–
СА-1	+++	+	–	–	–	–	–
СА-6	+++	+++	++	++	+	+	+
СА-7	+++	+	–	–	–	–	–
СП-2	+++	+	–	–	–	–	–
СП-3	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST71	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST72	+++	+++	+++	++	+++	+	+
DST73	+++	++	+	+	–	–	–
DST74	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST75	+++	+++	+++	++	++	+	+
DST76	+++	+++	+++	++	–	–	–
DST77	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST78	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST101	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST102	+++	+++	+++	+	–	–	–
DST103	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
DST104	+++	++	++	+	–	–	–
DST105	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
E9	+++	++	–	–	–	–	–
E10	+++	+++	+++	+++	++	+	–
Ср-1	+++	+++	+++	+++	++	+	+
Ср-7	+++	+++	+++	++	+	+	–
Ср-8	+++	+++	+++	++	++	+	+
СБ-1	+++	+++	+++	+++	++	+	–
СБ-3	+++	+++	+	–	–	–	–
С-1	+++	+++	+++	++	++	+	–
С-4	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
С-10	+++	+++	+++	++	++	+	+
С-12	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
С-14	+++	+++	+++	++	++	+	–
С-15	+++	+++	+++	+++	++	+	–

Окончание табл. 1

Изолят	Рост на агаризованной среде						
	Контроль	LB + 513 мМ NaCl	LB + 855 мМ NaCl	LB + 1197 мМ NaCl	LB + 1710 мМ NaCl	LB + 2052 мМ NaCl	LB + 2565 мМ NaCl
DST106	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST107	+++	+	–	–	–	–	–
DST108	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST109	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
DST110	+++	+++	+++	+++	+++	–	–
DST111	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
G101	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
G102	+++	+++	+++	+++	+++	–	–
G103	+++	+++	+++	+++	+++	+	–
G104	+++	+++	+++	–	–	–	–
G105	+++	+++	+++	+++	++	+	+
G106	+++	+++	+++	+	+	+	+
ФП2/1	+++	+++	+++	+++	++	+	–
ФП2/2	+++	+++	++	++	+	+	–
ФП2/3	+++	+++	++	++	+	–	–

Примечание. Здесь и в табл 2: «+++» – хороший рост; «++» – средний рост; «+» – слабый рост; «–» – отсутствие роста бактерий.

Анализ полученных данных показывает, что при низком содержании хлорида натрия в среде он менее токсичен для исследуемых микроорганизмов. Так, внесение в среду LB 513 и 855 мМ хлорида натрия не оказывало негативного влияния на рост большинства бактериальных изолятов. Большая часть бактерий были способны расти на среде, содержащей хлорид натрия в концентрациях 1197 и 1710 мМ. Наиболее устойчивыми к хлориду натрия были бактериальные изоляты Cp-1, Cp-8, C-4, C-10, C-12, DST72, DST74, DST75, DST77, DST78, DST101, DST103, DST111, G105, G106, ФП2/1, ФП2/2, E10. Максимальные концентрации NaCl для них составили 2052 и 2565 мМ, остальные изоляты не росли на агаризованной среде, содержавшей хлорид натрия в концентрации 2052–2565 мМ.

На следующем этапе работы проводили отбор солеустойчивых бактерий с учетом их азотфиксирующей активности и способности солюбилизировать фосфаты. Скрининг азотфиксирующих изолятов проводили среди отобранных 43 солеустойчивых бактерий, которые росли на среде, содержавшей хлорид натрия в концентрации 1710–2565 мМ, путем посева на твердые селективные питательные безазотистые среды Эшби и Бёрка (табл. 2).

Таблица 2. Рост солеустойчивых бактериальных изолятов на безазотистых средах Эшби и Бёрка

Table 2. Growth of halotolerant bacterial isolates on nitrogen-free Ashby and Bürk'a media

Изолят	Рост на агаризованной среде		Изолят	Рост на агаризованной среде	
	Эшби	Бёрка		Эшби	Бёрка
Co-2	+++	+++	DST74	+	+
Co-3	+++	+++	DST75	+	+
Co-5	–	–	DST76	+	+
Co-6	+++	+++	DST77	+	+
Co-7	–	–	DST78	+++	+++
Co-8	+++	+++	DST101	+	+
CA-6	+++	+++	DST102	+	+
СП-3	–	–	DST103	+	+
Cp-1	–	–	DST104	+++	+++
Cp-7	–	–	DST105	–	–
Cp-8	–	–	DST106	–	–
СБ-1	–	–	DST108	–	–
СБ-3	–	–	DST109	–	–

Окончание табл. 2

Изолят	Рост на агаризованной среде		Изолят	Рост на агаризованной среде	
	Эшби	Бёрка		Эшби	Бёрка
C-1	+++	+++	DST110	–	–
C-4	+++	+++	DST111	–	–
C-10	–	–	G101	–	–
C-12	+++	+++	G102	++	++
C-14	+++	+++	G103	++	++
C-15	+++	+++	G104	++	++
DST71	–	–	G105	++	++
DST72	+++	+++	G106	++	++
DST73	+	+	ФП2/1	+	+
E9	–	+	ФП2/2	–	–
E10	+++	+++	ФП2/3	–	+

Из выделенных и отобранных 43 солеустойчивых изолятов 28 имели хороший или средний рост на безазотистых средах Эшби и Бёрка. Далее для выявления азотфиксирующей активности у 28 выделенных олигонитрофильных изолятов определяли наличие *nifH*-гена в их геноме (рис. 1, 2).

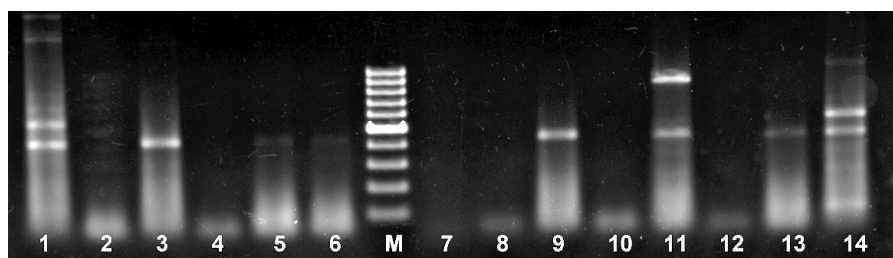


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-анализа солеустойчивых изолятов бактерий с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R: 1 – E10; 2 – *E. coli* (отрицательный контроль); 3 – DST72; 4 – DST73; 5 – DST74; 6 – DST75; M – маркер молекулярной массы ДНК (100 bp); 7 – DST76; 8 – DST77; 9 – DST78; 10 – DST101; 11 – DST102; 12 – DST103; 13 – DST104; 14 – ФП2/1

Fig. 1. Electrophoregram of PCR analysis of halotolerant bacterial isolates with a couple of primers *nifH*-1F and *nifH*-1R: 1 – E10; 2 – *E. coli* (negative control); 3 – DST72; 4 – DST73; 5 – DST74; 6 – DST75; M – DNA molecular weight marker (100 bp); 7 – DST76; 8 – DST77; 9 – DST78; 10 – DST101; 11 – DST102; 12 – DST103; 13 – DST104; 14 – ФП2/1

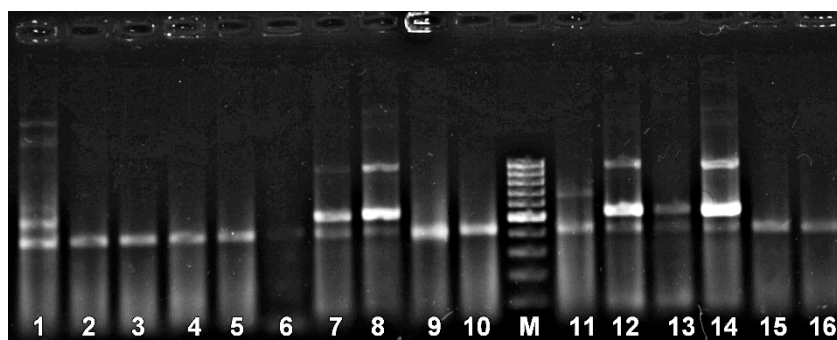


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-анализа солеустойчивых изолятов бактерий с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R: 1 – *Ensifer meliloti* S3 (положительный контроль); 2 – G102; 3 – G103; 4 – G105; 5 – C-1; 6 – *E. coli* (отрицательный контроль); 7 – C-4; 8 – C-12; 9 – C-14; 10 – C-15; M – маркер молекулярной массы ДНК; 11 – CA-6; 12 – C-15; 13 – Co-2; 14 – Co-3; 15 – Co-6; 16 – Co-8

Fig. 2. Electrophoregram of PCR analysis of halotolerant bacterial isolates with a couple of primers *nifH*-1F and *nifH*-1R: 1 – *Ensifer meliloti* S3 (positive control); 2 – G102; 3 – G103; 4 – G105; 5 – C-1; 6 – *E. coli* (negative control); 7 – C-4; 8 – C-12; 9 – C-14; 10 – C-15; M – DNA molecular weight marker (100 bp); 11 – CA-6; 12 – C-15; 13 – Co-2; 14 – Co-3; 15 – Co-6; 16 – Co-8

В ходе ПЦР-анализа фрагмента *nifH*-гена исследуемых 28 олигонитрофильных бактерий с парой праймеров *nifH*-1F и *nifH*-1R у DST72, DST78, DST102, DST104, G102, G103, G105, C-1, C-4, C-12, C-14, C-15, CA-6, Co-2, Co-3, Co-6, Co-8, E10 и ФП2/1 изолятов была выявлена специфиче-

ская зона ампліфікацыі размерам ~ 430 п. о., што прадполагае генетычнаска дэтэрмініраваную здольнасць аналізаваных бактэрый фіксіраваць азот атмасферы, а таксама іх прыналежнасць к азотфіксатарам.

Далее с паломощью ацетиленового метода определяли нитрогеназную активность в чистой культуре у 19 отобранных азотфиксирующих бактерий, содержащих *nifH*-ген. Средние данные по нитрогеназной (НГ) активности представлены в табл. 3.

Таблица 3. Нитрогеназная активность солеустойчивых бактериальных изолятов

Table 3. Nitrogenase activity of halotolerant bacterial isolates

Изолят	НГ-активность, нМ C_2H_4 /фл/3 сут	Изолят	НГ-активность, нМ C_2H_4 /фл/3 сут
C-1	32,9 ± 0,24	G102	33,3 ± 0,39
C-4	33,8 ± 0,29	G103	28,0 ± 0,34
C-12	25,4 ± 0,20	G105	58,9 ± 0,20
C-14	38,2 ± 0,55	DST72	33,8 ± 0,57
C-15	33,1 ± 0,29	DST78	37,0 ± 0,61
Co-2	35,7 ± 0,55	DST102	65,0 ± 0,50
Co-3	37,4 ± 0,36	DST104	54,3 ± 0,50
Co-6	32,6 ± 0,55	ФП2/1	60,7 ± 0,14
Co-8	33,9 ± 0,50	E10	34,9 ± 0,50
CA-6	44,0 ± 0,43		

Устаноўлена, што ўсе 19 ізолятаў фіксіравалі азот атмасферы, НГ актыўнасць колебалася ў межах ад 25,2 да 65,6 нМ C_2H_4 /фл/3 сут. Максімальная НГ-актыўнасць, выяўленая ў выдзеленых ізолятаў DST102, DST104, G105, ФП2/1, СА-6, складала 64,6; 53,9; 58,8; 65,6 і 44,0 нМ C_2H_4 /фл/3 сут адпаведна.

Из 43 бактериальных изолятов 5 были наиболее активными фосфатсолубилизаторами (Ср-1, DST75, DST101, ФП2/1, ФП2/2) и формировали зоны «гало» диаметром 7–9 мм. Для изолятов Ср-1, DST75 и ФП2/1, образующих максимальные зоны растворения Са-Р на агаризованной среде, установлены эффективность и индекс солубилизации фосфатов кальция. Наиболее эффективно солубилизовали фосфаты изоляты ФП2/1 (74 %) и Ср-1 (70 %), а наименьшей эффективностью обладали изоляты DST 75, DST 101 и ФП2/2 – 54, 56 и 59 % соответственно. У изолятов ФП2/1, Ср-1 отмечался также высокий индекс фосфатсолубилизации – 3,9 и 3,3 соответственно.

В ходе дальнейшей работы исследовали влияние солеустойчивых азотфиксирующих (DST102, DST104, G105, ФП2/1, СА-6) и фосфатсолубилизирующих (ФП2/1, Ср-1) бактериальных изолятов на энергию прорастания и всхожесть семян редиса розово-красного (*Raphanus sativus* var. *radicula*), который является наиболее чувствительной тест-культурой при определении фитотоксичности микроорганизмов и почвы (табл. 4).

Таблица 4. Влияние солеустойчивых изолятов на всхожесть семян, рост и развитие проростков редиса розово-красного

Table 4. Effect of halotolerant isolates on seed germination, growth and development of small radish seedlings

Солеустойчивый изолят	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина проростков	
			мм	% к контролю
Контроль	30	31	65	100
Ср-1	35	41	100	156
СА-6	35	43	92	143
DST 102	27	39	88	136
DST104	29	41	91	140
ФП2/1	35	41	91	142
G105	21	33	92	143

Установлено, что показатель энергии прорастания семян редиса варьируется от 21 до 35 % (максимальные значения у изолятов Ср-1, СА-6, ФП2/1). Инокуляция семян редиса розово-красного культуральной жидкостью солеустойчивых изолятов положительно влияла и на всхожесть семян. Наиболее активными стимуляторами были изоляты Ср-1, СА-6, ФП2/1, DST104. Всхожесть семян редиса при обработке этими бактериальными изолятами превышала контроль в среднем на 10–12 %. В ходе лабораторных исследований установлено, что наибольшей длины проростки достигали при инокуляции культуральной жидкостью солеустойчивых изолятов Ср-1, СА-6, G105, ФП2/1. Длина проростков увеличилась в среднем на 47 % по сравнению с контролем без инокуляции.

Инокуляция семян редиса культуральной жидкостью исследуемых изолятов способствовала увеличению накопления проростками биомассы, что положительно влияло на последующее развитие растений (рис. 3).

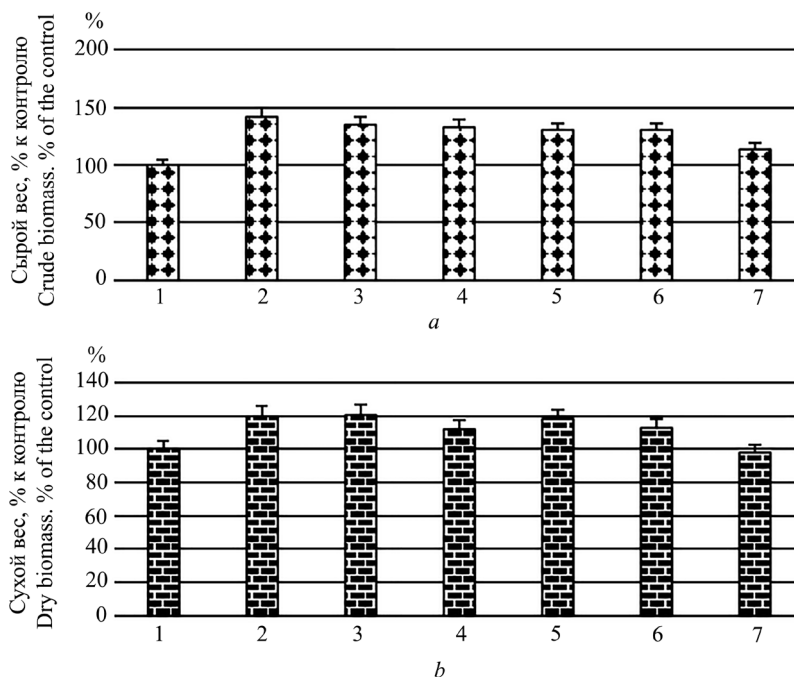


Рис. 3. Влияние наиболее эффективных солеустойчивых изолятов на накопление сырой (а) и сухой (б) биомассы проростками редиса розово-красного: 1 – контроль; 2 – Ср-1; 3 – СА-6; 4 – DST102; 5 – DST104; 6 – ФП2/1; 7 – G105

Fig. 3. Effect of most effective halotolerant isolates on accumulation of crude (a) and dry (b) biomass by seedlings of small radish: 1 – control; 2 – Cp-1; 3 – CA-6; 4 – DST102; 5 – DST104; 6 – ФП2/1; 7 – G105

В вариантах с инокуляцией семян наиболее эффективными были изоляты Ср-1 и СА-6, которые стимулировали увеличение сырой биомассы на 42 и 35 %, а сухой – на 20 и 21 % соответственно по сравнению с контролем. Установлено, что солеустойчивые изоляты DST102, DST104, G105, ФП2/1 также оказывали положительный эффект на накопление биомассы проростками редиса. Значения сырой биомассы превышали контроль в среднем на 27 %, сухой – на 14 %.

Таблица 5. Содержание ИУК в культуральной жидкости солеустойчивых изолятов

Table 5. The contents of IAA in the cultural liquid of salt-resistant isolates

Изолят	К-во ИУК, мкг/мл
Контроль (без инокуляции)	–
Ср-1	89,7 ± 0,58
СА-6	37,8 ± 0,09
ФП2/1	64,7 ± 0,03
DST102	18,3 ± 0,41
DST104	13,8 ± 0,09
G105	6,8 ± 0,26

Изучена способность отобранных солеустойчивых ростостимулирующих микроорганизмов синтезировать ауксины, в частности ИУК (табл. 5).

Установлено, что содержание ИУК в культуральной жидкости бактерий варьировалось в пределах 6,8–89,7 мкг ИУК/мл культуральной жидкости. Максимальная концентрация ИУК выявлена у изолятов Ср-1, СА-6

Установлено, что содержание ИУК в культуральной жидкости бактерий варьировалось в пределах 6,8–89,7 мкг ИУК/мл культуральной жидкости. Максимальная концентрация ИУК выявлена у изолятов Ср-1, СА-6

и ФП2/1 – 89,7; 37,8 и 64,7 мкг ИУК/мл соответственно. На основании неспецифического фитостимулирующего действия на семена редиса розово-красного отобраны наиболее эффективные изоляты DST102, ФП2/1, СА-6 и Ср-1, среди которых был проведен скрининг на способность переносить условия абиотического стресса, такие как засоление и засуха.

В настоящее время исследование большинства моделей засухи основывается на использовании в качестве непроникающего осмотического агента ПЭГ-6000, который ведет к снижению водного потенциала среды, а следовательно, к блокированию поглощения воды клеткой. В лабораторных условиях была создана модель засухи в жидкой среде LB с определенным значением водного потенциала: –0,20; –0,42; –1,31 МПа (табл. 6).

Таблица 6. Глубинное культивирование изолятов с различным водным потенциалом в условиях дефицита влаги

Table 6. Submersed cultivation of isolates exposed to water deficiency conditions differing in osmotic potential

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	–0,20 МПа	–0,42 МПа	–1,31 МПа
Ср-1			
0	$(8,67 \pm 0,643) \cdot 10^8$	$(8,60 \pm 0,400) \cdot 10^8$	$(8,20 \pm 0,529) \cdot 10^8$
24	$(7,67 \pm 0,416) \cdot 10^8$	$(7,27 \pm 0,503) \cdot 10^8$	$(7,07 \pm 0,808) \cdot 10^7$
48	$(7,40 \pm 0,611) \cdot 10^8$	$(7,07 \pm 0,400) \cdot 10^8$	$(2,27 \pm 0,306) \cdot 10^7$
ФП2/1			
0	$(9,00 \pm 0,400) \cdot 10^8$	$(9,07 \pm 0,702) \cdot 10^8$	$(9,00 \pm 0,200) \cdot 10^8$
24	$(1,73 \pm 0,114) \cdot 10^8$	$(1,41 \pm 0,042) \cdot 10^8$	$(9,13 \pm 0,306) \cdot 10^7$
48	$(1,45 \pm 0,053) \cdot 10^8$	$(1,18 \pm 0,020) \cdot 10^8$	$(5,20 \pm 0,600) \cdot 10^7$
DST102			
0	$(6,07 \pm 0,130) \cdot 10^8$	$(6,07 \pm 0,115) \cdot 10^8$	$(6,00 \pm 0,200) \cdot 10^8$
24	$(1,83 \pm 0,031) \cdot 10^7$	$(1,50 \pm 0,072) \cdot 10^7$	$(9,73 \pm 0,306) \cdot 10^7$
48	$(1,25 \pm 0,050) \cdot 10^7$	$(1,09 \pm 0,083) \cdot 10^6$	$(8,07 \pm 0,306) \cdot 10^6$
СА-6			
0	$(6,87 \pm 0,416) \cdot 10^8$	$(6,67 \pm 0,833) \cdot 10^8$	$(6,80 \pm 0,721) \cdot 10^8$
24	$(5,80 \pm 0,200) \cdot 10^8$	$(2,95 \pm 0,076) \cdot 10^8$	$(9,20 \pm 0,200) \cdot 10^7$
48	$(4,93 \pm 0,231) \cdot 10^8$	$(2,79 \pm 0,090) \cdot 10^8$	$(6,60 \pm 0,600) \cdot 10^7$

Установлено, что засуха, вызванная ПЭГ-6000, влияет на рост всех изолятов. Однако между вариантами при глубинном культивировании изолятов Ср-1, ФП2/1, СА-6 с осмотическим потенциалом –0,20 и –0,42 МПа существенной разницы по титрам жизнеспособных клеток по сравнению с первоначальным титром в 0 ч не отмечено. Число колониеобразующих единиц изолятов Ср-1, ФП2/1, СА-6 на вторые сутки культивирования в жидкой среде LB с концентрацией ПЭГ-6000 3 % составило $7,40 \cdot 10^8$, $1,45 \cdot 10^8$ и $4,93 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно, а при концентрации 5 % – $7,07 \cdot 10^8$, $1,18 \cdot 10^8$ и $2,79 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. При культивировании изолятов DST102 в условиях осмотического потенциала –0,20 МПа титр клеток уменьшился в 48,7 раза, а при стрессе (–0,42 МПа) – в 55,5 раза по сравнению с первоначальным титром в 0 ч. Численность жизнеспособных клеток у изолятов DST102 через 48 ч культивирования в опыте с осмотическим потенциалом –0,20 МПа составила $1,25 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а в опыте с потенциалом –0,42 МПа – $1,09 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Водный потенциал –1,31 МПа негативно влиял на все изоляты. Количество жизнеспособных клеток у всех изолятов уменьшилось до 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. Учитывая изложенное выше, для дальнейшего изучения были отобраны изоляты ФП2/1, СА-6 и Ср-1, которые лучше росли в условиях засухи, вызванной ПЭГ-6000.

В лабораторных условиях проведен опыт на способность изолятов Ср-1, СА-6 и ФП2/1 переносить условия осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в концентрациях 1197, 1710 и 2052 мМ (рис. 4).

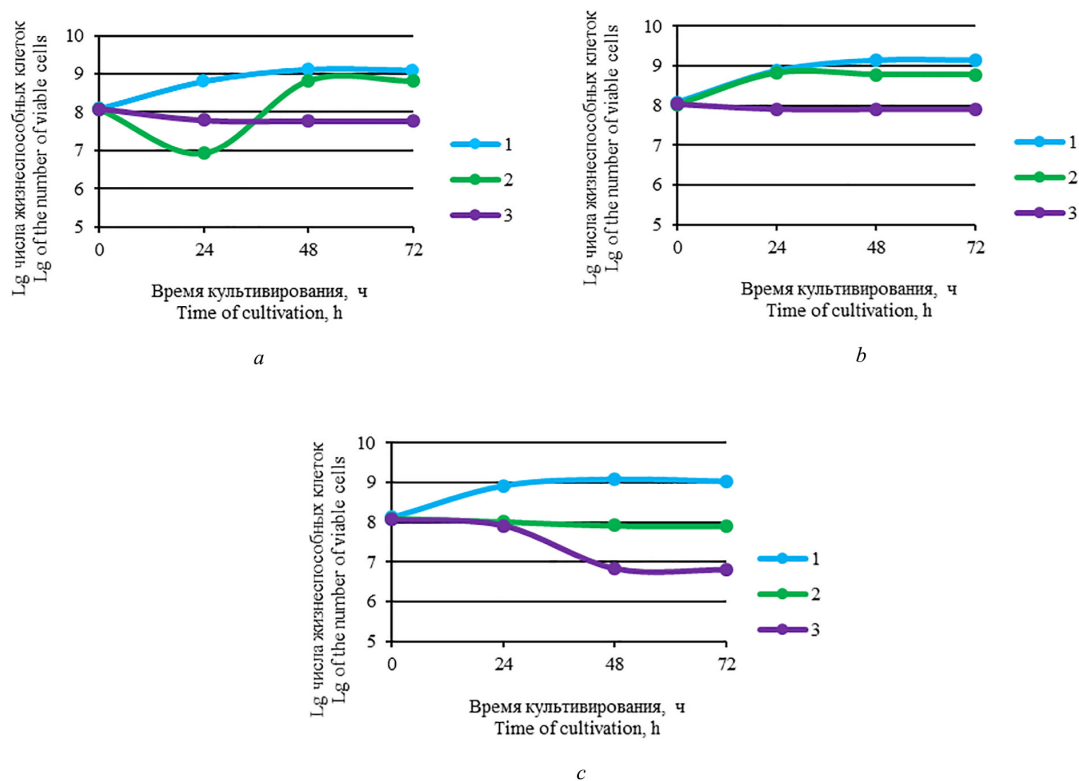


Рис. 4. Глубинное культивирование изолятов Ср-1 (а), СА-6 (b), ФП2/1 (с) в условиях осмотического стресса, вызванного хлоридом натрия в разной концентрации: 1 – среда LB + 1197 мМ NaCl; 2 – среда LB + 1710 мМ NaCl; 3 – среда LB + 2052 мМ NaCl

Fig. 4. Submerged culture of isolates Cp-1 (a), CA-6 (b), ФП2/1 (c) subjected to osmotic stress induced by various levels of sodium chloride: 1 – LB medium + 1197 mM NaCl; 2 – LB medium + 1710 mM NaCl; 3 – LB medium + 2052 mM NaCl

Установлено, что осмотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрации 1197 мМ, не оказывает негативного эффекта на микроорганизмы Ср-1, СА-6, ФП2/1: максимальный титр жизнеспособных клеток достигается через 48 ч и составляет $1,27 \cdot 10^9$, $1,40 \cdot 10^9$ и $1,20 \cdot 10^9$ КОЕ/мл соответственно. При концентрации NaCl в среде 1710 мМ у всех изолятов Ср-1, СА-6, ФП2/1 наблюдается снижение числа колониеобразующих единиц, особенно в первые 24 ч, что свидетельствует о негативном влиянии высокого содержания соли в среде и реакции клеток на стресс. Однако у изолята Ср-1 количество клеток за первые сутки культивирования снижалось до 10^6 КОЕ/мл, а на вторые сутки вновь увеличивалось до 10^8 КОЕ/мл, что свидетельствует о способности изолята переносить неблагоприятные условия среды. Хлорид натрия в концентрации 1710 мМ оказывал негативное влияние и на численность клеток изолятов СА-6 и ФП2/1. Титр жизнеспособных клеток у изолята СА-6 через 24 ч культивирования снижался до $6,60 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и сохранялся в течение всего времени культивирования, а у изолята ФП2/1 наблюдалось снижение численности клеток до 10^7 КОЕ/мл на вторые сутки культивирования. Осмотический стресс, вызванный содержанием соли в среде в количестве 2052 мМ, негативно влиял на изоляты Ср-1, СА-6, ФП2/1: число колониеобразующих единиц через 48–72 ч падало до 10^6 КОЕ/мл, что свидетельствует о токсичности высоких доз хлорида натрия.

В соответствии с целью нашего исследования наиболее перспективными для дальнейших исследований являются изоляты СА-6, Ср-1, которые обладают азотфиксирующей, фосфатсольюбилизирующей и ростстимулирующей активностью и способны переносить абиотический стресс, вызванный повышенным содержанием хлорида натрия и дефицитом влаги в среде.

Для таксономической характеристики и видовой идентификации изолятов Ср-1 и СА-6 было осуществлено секвенирование гена 16S рРНК по Сэнгеру. При секвенировании переменных участков гена, кодирующих 16S рРНК, были получены нуклеотидные последовательности, кото-

рыя сьравнівалі с пасьледавальнасьцямі штаммоў блізкародзественных відаў, прадставленых в базе даных GenBank. Ааналіз пасьледавальнасьці нуклеотыдаў варыябельных участкаў генаў, кодуючых 16S рРНК, паказал, што тэстуваны ізолят Ср-1 на 98 % гомалогічэн штамму *Bacillus sp.* і на 97 % – штаммам *Bacillus megaterium* і *Bacillus aryabhatai*, а аналізаваная нуклеотыдная пасьледавальнасьць фрагмэнта гена 16S рРНК ізолята СА-6 на 95 % ідэнтычна такой у бактэрыяў штаммоў *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus jostii* і *Rhodococcus opacus*.

Філагенетычны аналіз нуклеотыдных пасьледавальнасьцей гена 16S рРНК ізолята Ср-1 паказал, што ісьледуемая пасьледавальнасьць на 89 і 85 % сходна с такіх гомалогічных генаў бактэрыяў відаў *Bacillus aryabhatai* ER 12 і *Bacillus sp.* VK-7 адпаведна (рыс. 5).

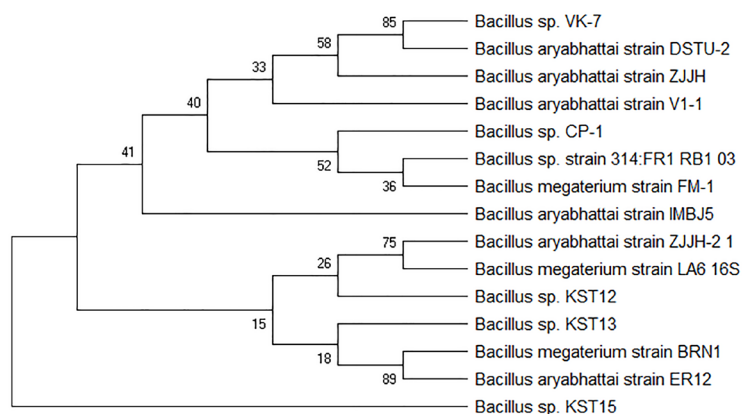


Рис. 5. Філагенетычнае дрэва, пабудаванае метадам «прысааіненія саседаў» па рэзультаце сьравніцельнага аналізу нуклеотыдных пасьледавальнасьцей фрагмэнтаў гена 16S рРНК штамму *Bacillus sp.* Ср-1 і штаммоў блізкародзественных відаў

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed by “neighbor adjointment” technique and based on comparative analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments from strain *Bacillus sp.* Ср-1 and strains of closely related species

Філагенетычнае сьравнэньне атрыманай нуклеотыднай пасьледавальнасьці фрагмэнта гена 16S рРНК ізолята СА-6 пазваліла ўстанавіць, што фрагмэнт гена 16S рРНК на 93 і 97 % гомалогічэн генам 16S рРНК штаммоў *Rhodococcus jostii* IFO 16295 і *Rhodococcus opacus* DSM43205 адпаведна (рыс. 6).

Для аадрэалення відавонай прынааіленнасьці ізолятаў Ср-1 і СА-6 правэна таажа ідэнтыфікацыя на аснове ісьлеауааньня сьпэктроў белаковых прафіляў пры памаці MALDI-TOF мас-сьпэктраметрыі. В рэзультаце правэнаааньня ўстанавлена, што ізолят Ср-1 на 99,9 % ідэн-

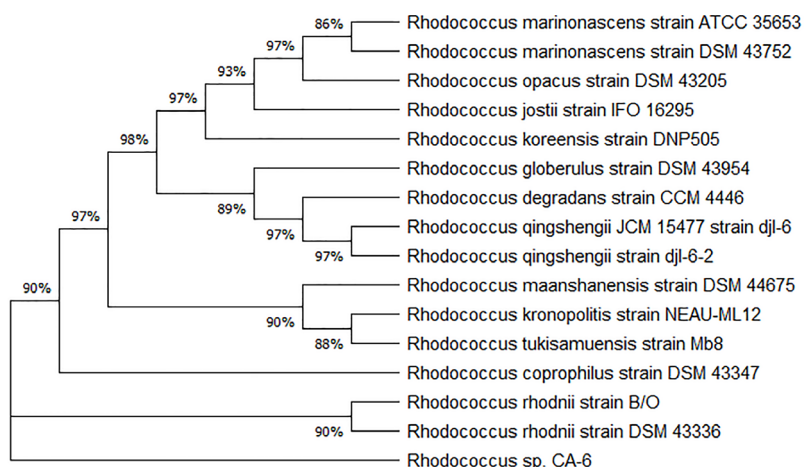


Рис. 6. Філагенетычнае дрэва, пабудаванае метадам «прысааіненія саседаў» па рэзультаце сьравніцельнага аналізу нуклеотыдных пасьледавальнасьцей фрагмэнтаў гена 16S рРНК штамму *Rhodococcus sp.* СА-6 і штаммоў блізкародзественных відаў

Fig. 6. Phylogenetic tree constructed by “neighbor adjointment” technique and based on comparative analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene fragments from strain *Rhodococcus sp.* СА-6 and strains of closely related species

тичен штамму *Bacillus megaterium*, а изолят СА-6 – на 99,9 % штамму *Rhodococcus jostii*. Данные по идентификации при секвенировании фрагмента гена 16S рРНК и MALDI-TOF масс-спектрометрии показывают, что исследуемые изоляты Ср-1 и СА-6 принадлежат к бактериям со следующим таксономическим положением: изолят Ср-1 – домен *Bacteria*, тип *Firmicutes*, класс *Bacilli*, порядок *Bacillales*, семейство *Bacillaceae*, род *Bacillus*, вид *Bacillus megaterium*. В связи с изменениями в таксономии бактерий рода *Bacillus* видовое название *Bacillus megaterium* изменено на *Priestia megaterium*; изолят СА-6 – домен *Bacteria*, тип *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, порядок *Corynebacteriales*, семейство *Nocardiaceae*, род *Rhodococcus*, вид *Rhodococcus jostii*. Штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под регистрационными номерами БИМ В-1314Д и БИМ В-1353Д соответственно.

Таким образом, бактериальные штаммы *Rhodococcus jostii* СА-6 и *Priestia megaterium* Ср-1 могут быть использованы в качестве азотфиксирующего и фосфатсольбилизирующего компонентов при создании микробного препарата для минимизации негативного влияния абиотических факторов, таких как засоление и дефицит влаги.

Заключение. Впервые выделены и идентифицированы азотфиксирующий штамм *Rhodococcus jostii* СА-6 и фосфатсольбилизирующий штамм *Priestia megaterium* Ср-1, способные переносить абиотический стресс, вызванный хлоридом натрия в концентрациях 1710 и 2565 мМ соответственно и дефицитом влаги при водном потенциале $-0,20$ и $-0,42$ МПа. Солеустойчивый штамм *Priestia megaterium* Ср-1 способен сольбилизовать фосфаты с образованием зон «галло» 9 мм, а штамм *Rhodococcus jostii* СА-6 обладает нитрогеназной активностью 44,0 нМ C_2H_4 /фл/3 сут. Штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 являются ростстимулирующими микроорганизмами, что обусловлено их способностью синтезировать ИУК в концентрациях 89,7 и 37,8 мкг ИУК/мл культуральной жидкости соответственно. Солеустойчивые штаммы *Priestia megaterium* Ср-1 и *Rhodococcus jostii* СА-6 депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-1314Д и БИМ В-1353Д соответственно.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б17АРМ-044).

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории «Центр аналитических и гено-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси за помощь в проведении идентификации бактериальных изолятов.

Acknowledgements. This study was financially supported by Belarusian Republican Foundation for Basic Investigations (project No. B17ARM-044).

The authors express sincere gratitude to the researchers of the “Center of analytical and genetic engineering research”, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, for assistance provided in the course of identification of bacterial isolates.

Список использованных источников

1. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils / D. Egamberdieva [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – Art. 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
2. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions / N. Hedi [et al.] // *Int. J. Microbiol.* – 2009. – Vol. 2009. – Art. ID 731786. <https://doi.org/10.1155/2009/731786>
3. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil / S. Zhang [et al.] // *Canad. J. Microbiol.* – 2018. – Vol. 64, N 12. – P. 968–978. <https://doi.org/10.9755/cjfa.v25i2.7590>
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук ; пер. с англ. А. А. Баева [и др.] ; под ред. К. Г. Скрыбина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
5. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги ; пер. с венг. И. Ф. Куренко ; под ред. Г. С. Муромцева. – М. : Колас, 1983. – 296 с.
6. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / Д. Г. Звягинцев [и др.] ; под ред. Д. Г. Звягинцева. – М. : Изд-во МГУ, 1980. – 224 с.
7. Методы общей бактериологии : в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1983. – Т. 3. – 264 с.
8. Yadav, A. Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere / A. Yadav, K. Yadav, A. Vashistha // *J. Appl. Nat. Sci.* – 2016. – Vol. 8, N 1. – P. 93–96. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.754>
9. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth / Q. A. Panhwar [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9, N 10. – P. e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
10. Умаров, М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М. М. Умаров // *Почвоведение.* – 1976. – № 11. – С. 119–123.
11. Sarwar, M. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria / M. Sarwar, R. J. Kremer // *Plant Soil.* – 1995. – Vol. 172. – P. 261–269. <https://doi.org/10.1007/BF00011328>

12. Возняковская, Ю. М. Микрофлора растений и урожай / Ю. М. Возняковская. – Л. : Колос, 1969. – 240 с.
13. Guo, R. Effects of water stress on germination and growth of linseed seedlings (*Linum usitatissimum* L.), photosynthetic efficiency and accumulation of metabolites / R. Guo, W. P. Hao, D. Z. Gong // J. Agricult. Sci. – 2012. – Vol. 4, N 10. – P. 253–265. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n10p253>
14. Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice / S. H. Habib [et al.] // Int. J. Agricult. Biol. – 2015. – Vol. 18, N 1. – P. 184–191. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0094>
15. Genetic diversity and phylogeny of alfalfa nodulating rhizobia assessed by *nifH* and *nodA* genes / A. A. S. Toolarood [et al.] // Int. Res. J. Appl. Basic Sci. – 2012. – Vol. 3, N 7. – P. 1470–1476.
16. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W. G. Weisburg [et al.] // J. Bacteriol. – 1991. – Vol. 173, N 2. – P. 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

References

1. Egamberdieva D., Wirth S., Bellingrath-Kimura S. D., Mishra J., Arora N. K. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 2019, vol. 10, art. 2791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
2. Hedi A., Sadfi N., Fardeau M-L., Rebib H., Cayol J-L., Ollivier B., Boudabous A. Studies on the biodiversity of halophilic microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under aerobic conditions. *International Journal of Microbiology*, 2009, vol. 2009, art. ID 731786. <https://doi.org/10.1155/2009/731786>
3. Zhang S., Fan C., Wang Y., Xia Y., Xiao W., Cui X. Salt-tolerant and plant-growth-promoting bacteria isolated from high-yield paddy soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, vol. 64, no. 12, pp. 968–978. <https://doi.org/10.9755/cjfm.v25i2.7590>
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Moscow, Mir Publ., 1984. 479 p. (in Russian).
5. Segi I. *Methods of soil microbiology*. Moscow, Kolas Publ., 1983. 296 p. (in Russian).
6. Zvyagintsev D. G., Aseeva I. V., Bab'eva I. P., Mirchink T. G. *Methods of soil microbiology and biochemistry*. Moscow, Moscow State University Publishing House, 1980. 224 p. (in Russian).
7. Gerhardt P. (ed.). *Manual of methods for general bacteriology*. Vol. 3. Moscow, Mir Publ., 1983. 264 p. (in Russian).
8. Yadav A., Yadav K., Vashistha A. Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere. *Journal of Applied and Natural Science*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 93–96. <https://doi.org/10.31018/jans.v8i1.754>
9. Panhwar Q. A., Naher U. A., Jusop Sh., Othman R., Latif Md. A., Ismail M. R. Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 10, p. e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
10. Umarov M. M. Acetylene method of studying nitrogen fixation in soil microbiology investigations. *Pochvovedenie [Soil Science]*, 1976, no. 11, pp. 119–123 (in Russian).
11. Sarwar M., Kremer R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil*, 1995, vol. 172, pp. 261–269. <https://doi.org/10.1007/BF00011328>
12. Voznyakovskaya Yu. M. *Plant microflora and harvests*. Leningrad, Kolos Publ., 1969. 240 p. (in Russian).
13. Guo R., Hao W. P., Gong D. Z. Effects of water stress on germination and growth of linseed seedlings (*Linum usitatissimum* L.), photosynthetic efficiency and accumulation of metabolites. *Journal of Agricultural Science*, 2012, vol. 4, no. 10, pp. 253–265. <https://doi.org/10.5539/jas.v4n10p253>
14. Habib S. H., Kausar H., Saud H. M., Ismail M. R., Othman R. Molecular characterization of stress tolerant plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for growth enhancement of rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2015, vol. 18, no. 1, pp. 184–191. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0094>
15. Toolarood A. A. S., Alikhani H. A., Salehi Gh., Asadi-Rahmani H., Khavazi K., Poorbabaee A. A., Lindström K. Genetic diversity and phylogeny of alfalfa nodulating rhizobia assessed by *nifH* and *nodA* genes. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 2012, vol. 3, no. 7, pp. 1470–1476.
16. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, vol. 173, no. 2, pp. 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Информация об авторах

Наумович Надежда Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: naumovichnadezda@yandex.ru

Алесченкова Зинаида Михайловна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: z_aleschenkova@tut.by

Ананьева Ирина Николаевна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by

Сафронова Галина Владимировна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: hsafronava@mail.ru

Information about the authors

Nadezhda I. Naumovich – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: naumovichnadezda@yandex.ru

Zinaida M. Aleschenkova – D. Sc. (Biol.), Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: z_aleschenkova@tut.by

Irina N. Ananyeva – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ananeva@mbio.bas-net.by

Halina V. Safronava – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hsafronava@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.344
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-66-74>

Поступила в редакцию 09.06.2021
Received 09.06.2021

Т. В. Самович, Е. В. Вязов, Р. Г. Гончарик, Е. И. Печёнкина, Н. В. Козел

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КАРОТИНОГЕНЕЗ В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ИЗБЫТКА NaCl В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ

Аннотация. Исследованы параметры роста и развития микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, а также процесс каротиногенеза, включая пигментный состав и экспрессию ключевых генов биосинтеза астаксантина, в клетках водоросли в условиях совместного действия света высокой интенсивности и избытка NaCl в среде культивирования. Установлено, что сочетание избытка NaCl в среде культивирования *Haematococcus pluvialis*, инициированного на стадии покоя микроводоросли, и действия света высокой интенсивности не является эффективным способом индукции накопления астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*. Выявлено снижение уровня экспрессии одного из ключевых генов каротиногенеза, кодирующего фитоинсинтазу, в таких условиях. В то же время установлено, что совместное действие света высокой интенсивности и избытка NaCl приводит к повышению доли более ценных с точки зрения биотехнологии *cis*-изомеров астаксантина в общем пуле пигмента.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, солевой стресс, свет высокой интенсивности, каротиногенез, астаксантин

Для цитирования: Каротиногенез в клетках *Haematococcus pluvialis* при совместном действии избытка NaCl в среде культивирования и света высокой интенсивности / Т. В. Самович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 66–74. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-66-74>

Tatsiana V. Samovich, Yauhen V. Viazau, Ruslan G. Goncharik, Elizaveta I. Pechenkina, Nikolai V. Kozel

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

CAROTENOGENESIS IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* CELLS UNDER THE COMBINED ACTION OF EXCESS OF NaCl IN THE CULTURE MEDIUM AND HIGH LIGHT INTENSITY

Abstract. The parameters of growth and development of the microalga *Haematococcus pluvialis*, as well as the process of carotenogenesis, including the pigment composition and expression of the key genes of astaxanthin biosynthesis, were studied in algal cells under the combined action of excess of NaCl in the culture medium and high light intensity. It was found that the combination of excess of NaCl in the culture medium for *Haematococcus pluvialis*, initiated at the resting stage of the microalga, and high light intensity is not an effective method for induction of the accumulation of astaxanthin in the cells of *Haematococcus pluvialis*. A decrease in the level of expression of one of the key genes of carotenogenesis – phytoene synthase gene, was revealed under such conditions. At the same time, it was found that the combined action of high light intensity and excess of NaCl led to an increase in the ratio of astaxanthin *cis*-isomers, which are more biotechnologically valuable, in the total pigment pool.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, salt stress, high light intensity, carotenogenesis, astaxanthin

For citation: Samovich T. V., Viazau Ya. V., Goncharik R. G., Pechenkina E. I., Kozel N. V. Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis* cells under the combined action of excess of NaCl in the culture medium and high light intensity. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 66–74 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-66-74>

Введение. Кетокаротиноид астаксантин – один из наиболее эффективных из известных на сегодняшний день природных антиоксидантов. Установлено, что его антиоксидантная активность в определенных условиях на порядок выше, чем у β -каротина и α -токоферола [1–3]. Астаксантин используется в пищевой и фармацевтической промышленности, а также в косметологии. В отличие от β -каротина, астаксантин не является провитамином А, поэтому норму его суточного потребления по медицинским показаниям можно увеличивать до 20 мг/сут без угрозы побочных эффектов, характерных для высоких концентраций витамина А [1, 4, 5]. Кроме того, астаксантин обладает ярко выраженным противовоспалительным действием, а также способно-

стью проникать через гематоэнцефалический барьер, что определяет его эффективность при профилактике и лечении заболеваний центральной нервной системы [1].

Астаксантин присутствует у многих ракообразных и рыб, окрашивая их в специфический цвет (лосось, форель, омары, креветки, крабы), а также продуцируется водорослями, грибами, бактериями и некоторыми высшими растениями. Однако наибольшее количество этого антиоксиданта содержится в клетках зеленой жгутиковой водоросли гематококка (*Haematococcus pluvialis*), составляя до 5 % от сухой массы. В нормальных условиях клетки гематококка имеют зеленую окраску и достаточно подвижны. Однако при попадании в неблагоприятные стрессовые условия, такие, например, как действие света высокой интенсивности или повышение концентрации соли в среде обитания водоросли, клетки гематококка прекращают рост, превращаясь в неподвижные цисты, и начинают накапливать астаксантин для защиты от окислительных повреждений, вызванных активными формами кислорода, повышение уровня которых обусловлено индуцированным стрессом. При этом клетки водоросли приобретают насыщенно-красный цвет. Отсюда водоросль и получила свое латинское название – *Haematococcus* (от греч. *haima* и *kokkos* – «кровавое семя»). В стрессовых условиях астаксантин накапливается в липидных везикулах в цитозоле – сначала вблизи ядра, а затем мигрируя на периферию клетки.

H. pluvialis выращивают во многих странах мира для получения каротиноидов – β -каротина и астаксантина [1, 3, 4]. Впервые его выращивание для получения астаксантина было налажено в Японии (Fuji Chemical Industry, 1997 г.) [6] и США (Cyanotech, 1998 г.) [7]. Кроме того, *H. pluvialis* внесен в список видов водорослей, разрешенных для непосредственного употребления в пищу практически во всех странах мира [8].

Себестоимость получения астаксантина из водорослей в настоящее время почти в 3 раза выше, чем синтетического продукта [9, 10]. Поэтому исследования, направленные на увеличение как продуктивности *H. pluvialis*, так и каротиногенеза в его клетках, являются весьма актуальными. В частности, ранее нами было показано, что избыток NaCl стимулирует накопление в клетках водоросли астаксантина [11]. Однако наблюдаемое при этом увеличение продукции этого каротиноида в таких условиях было не столь существенным, как при действии света высокой интенсивности [12]. Представляет большой интерес изучить сочетанное действие указанных выше стрессовых факторов на клетки гематококка.

В рамках данной работы были исследованы особенности роста и развития *H. pluvialis*, а также каротиногенеза в клетках водоросли в условиях совместного действия света высокой интенсивности и засоления питательной среды (избытка NaCl) с целью изучения перспектив получения биомассы гематококка, обогащенной антиоксидантом астаксантином.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis*, штамм ИВСЕ Н-17, из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [13]. Клетки гематококка, взятые из альгологической коллекции, стерильно пересевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой ВВМ, подращивали на свету в течение 7–10 сут при температуре 23 ± 2 °С, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [14] и выращивали в накопительном режиме при освещении светом люминесцентных ламп Philips TD-36/765, освещенности 1500 лк и режиме 14 ч света – 10 ч темноты в световом периоде при температуре 23 ± 2 °С. Через 10–14 сут выращивания суспензию гематококка, содержащую около 80 % неподвижных клеток, использовали в экспериментах. Водоросли выращивали в стеклянных колбах объемом 50 мл (рабочий объем 40 мл) в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре 23 ± 1 °С и освещенности 2000 и 10 000 лк. Для создания избытка соли в питательную среду вносили NaCl до концентрации 100 мМ. В опытах использовали следующие варианты: 1 – стандартная среда, освещенность 2000 лк; 2 – среда с избытком NaCl, освещенность 2000 лк; 3 – стандартная среда, освещенность 10 000 лк; 4 – среда с избытком NaCl, освещенность 10 000 лк.

При постановке эксперимента и через 21 сут культивирования определяли количество клеток в суспензии, их размер и содержание астаксантина. Количество клеток в культуре водоросли оценивали при помощи камеры Горяева. Диаметр клеток гематококка определяли с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, используя программное обеспечение NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40 (Nikon, Япония).

Качественную и количественную оценку содержания хлорофиллов и каротиноидов в образцах осуществляли с помощью хроматографа высокого давления Shimadzu Prominence LC 20 (Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (тип C18, размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey–Nagel (Германия). В основу метода выделения, разделения и идентификации пигментов были положены методики, описанные в работах [15–17]. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически, используя детектор с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм (для фотосинтетических пигментов) и 475 нм (для астаксантина). Площади пиков хроматограммы, определенные с помощью программного обеспечения Shimadzu LC Solution, использовали для количественного определения пигментов. Фотосинтетические пигменты экстрагировали в ацетон, а астаксантин – в метанол. Астаксантин с жирными кислотами образует большое количество эфиров. В связи с этим для точного количественного определения последнего в метанольных экстрактах перед хроматографией проводили процедуру сапонификации: вносили 20 мкл 1 М КОН на 1 мл экстракта и инкубировали 6 ч при комнатной температуре. После сапонификации жирные кислоты отщеплялись и астаксантин выходил в виде нескольких стереоизомеров, среди которых преобладал транс-астаксантин [18].

Для определения уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих в клетках *H. phuvialis* ключевые ферменты биосинтеза астаксантина – фитоинсинтазу и β -каротингидроксилазу соответственно, выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol (Applied Biosystems, Германия) и синтезировали кДНК с использованием ProtoScript II Reverse Transcriptase “BioLabs” в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием ген-специфических праймеров и гена-нормализатора, кодирующего актин. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мкл кДНК, 10 пмоль каждого праймера, 4 мкл 2,5 \times реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии EvaGreen («Синтол», Россия) и воду. ПЦР-РВ проводили с использованием термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: предварительная денатурация – 95 °С, 5 мин; плавление – 95 °С, 15 с; отжиг – 55–61 °С, 45 с. Количество циклов амплификации – 40. Для регистрации и анализа полученных кривых амплификации использовали программное обеспечение Bio-Rad CFX Maestro, с помощью которого рассчитывали относительную нормализованную экспрессию изучаемых генов по методу Ливак [19].

В работе приведены средние значения из 3–5 экспериментов и их стандартные отклонения. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2019, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследований были проанализированы продуктивность гематококка и морфометрические показатели клеток микроводоросли при совместном действии на них избытка NaCl в среде культивирования и света высокой интенсивности.

Поскольку для проведения экспериментов использовали культуру, прошедшую стадию активного роста и перешедшую в стадию покоя, количество подвижных клеток подсчитывали только при постановке эксперимента. В культуре при постановке экспериментов клетки были круглые, в основном неподвижные (подвижных не более 10–30 %).

Внешний вид суспензии гематококка спустя 21 сут культивирования водоросли на полной среде Рудика и среде Рудика с избытком NaCl показан на рис. 1. Заметно, что в вариантах 3 (10 000 лк, стандартная среда) и 4 (10 000 лк, избыток NaCl) наблюдалось существенное изменение окраски суспензии, очевидно связанное с изменением пигментного состава клеток водоросли.

Установлено, что через 21 сут эксперимента количество клеток в суспензии снижалось во всех вариантах. Наиболее значительное снижение отмечено в вариантах на среде Рудика с избытком NaCl вне зависимости от интенсивности освещения (рис. 2, а). В этих же вариантах наблюдали увеличение диаметра клеток (рис. 2, б), что является признаком стрессового состояния клеток водоросли [20]. В вариантах на стандартной среде Рудика количество клеток снижалось, а их диаметр также увеличивался по сравнению с начальным значением вне зависимости от освещения.



Рис. 1. Суспензия гематококка на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (2000 лк, варианты 1 и 2) и на свете высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Fig. 1. Suspension of *H. pluvialis* in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) after incubation for 21 days under normal light (2000 lx, variants 1 and 2) and under high-intensity light (10 000 lx, variants 3 and 4)

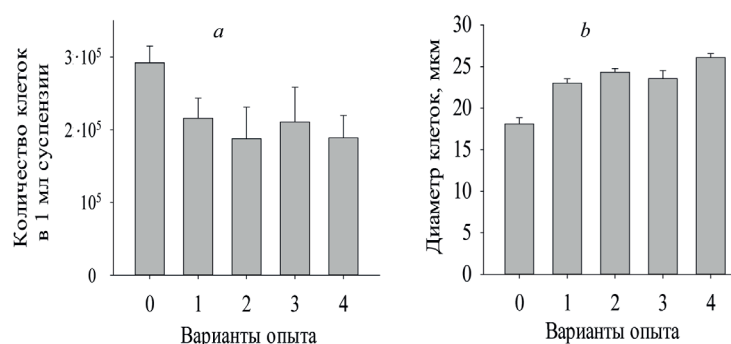


Рис. 2. Количество клеток *H. pluvialis* (a) и их диаметр (b) в начале (0) и через 21 сут (1–4) эксперимента на стандартной среде Рудика (0, 1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) при освещенности 2000 лк (1, 2) и 10 000 лк (3, 4)

Fig. 2. The number of *H. pluvialis* cells (a) and their diameter (b) at the start (0) and after 21 days (1–4) of the experiment in standard Rudic medium (0, 1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) at illumination of 2000 lx (1, 2) and 10 000 lx (3, 4)

Анализ содержания фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis* с помощью ВЭЖХ позволил выявить в исследуемых препаратах наличие каротиноидов (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β -каротина) и хлорофиллов *a* и *b*.

В клетках культуры гематококка, выращенной на среде Рудика при обычной интенсивности света, через 21 сут регистрировали снижение содержания каротиноидов (неоксантина – на 31 %, лютеина – на 61, каротина – на 49 %) и хлорофиллов *a* и *b* – на 60 и 65 % соответственно. В варианте опыта с избытком соли наблюдали не такое значительное снижение содержания каротиноидов – до 83,9 %, а содержание хлорофиллов *a* и *b* снизилось на 48 и 52 % соответственно. В культуре, помещенной в условия избыточного освещения, регистрировали значительное снижение содержания хлорофиллов *a* и *b* – до 12 и 18 % от контроля в обычной культуре и до 36 и 33 % от контроля в культуре с избытком соли. Большинство каротиноидов в культуре на стандартной среде Рудика и при ярком свете не детектировалось, а в культуре с избытком NaCl в таких условиях их содержание изменялось незначительно по сравнению с таковым при действии света нормальной интенсивности (табл. 1). Таким образом, избыток соли при интенсивном освещении культуры гематококка не приводил к заметным изменениям в пигментном составе по сравнению с культурой на нормальной среде Рудика в таких условиях. Соотношение фотосинтетических каротиноидов к хлорофиллу изменялось незначительно, оставаясь на уровне 0,17–0,25 в вариантах на стандартной среде Рудика. В клетках культуры на среде Рудика с избытком NaCl и повышенной интенсивностью света это соотношение увеличивалось в 1,4–2,1 раза (по сравнению с нормальной освещенностью и с начальной культурой).

Т а б л и ц а 1. Содержание фотосинтетических пигментов (пг на клетку) в клетках *H. pluvialis* на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (2000 лк, варианты 1 и 2) и на свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Table 1. Content of photosynthetic pigments in *H. pluvialis* cells in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with an excess of NaCl (2, 4) after incubation for 21 days under normal light (2000 lx, variants 1 and 2) and under high-intensity light (10000 lx, variants 3 and 4)

Вариант опыта	Неоксантин	Виолаксантин	Лютеин	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>a</i>	β-каротин	Сумма каротиноидов
Начальная культура	0,88 (100)	0,47 (100)	5,62 (100)	18,55 (100)	35,99 (100)	4,23 (100)	11,20 (100)
1	0,65 (69,10)	0,44 (86,75)	2,25 (39,29)	6,77 (34,97)	14,88 (39,86)	2,17 (50,26)	5,50 (49,1)
2	0,73 (82,41)	0,41 (82,75)	4,06 (70,94)	9,19 (48,43)	18,93 (51,97)	3,52 (83,93)	8,71 (77,6)
3	н. о.	н. о.	1,29 (23,13)	3,29 (18,13)	4,45 (12,37)	н. о.	1,29 (11,51)
4	0,56 (64,84)	0,34 (72,13)	3,74 (65,21)	6,18 (32,80)	13,25 (36,70)	3,77 (68,33)	8,41 (75,1)

Пр и м е ч а н и е. В скобках указан процент к контролю, н. о. – не обнаружено.

С целью изучения перспективности использования совместного действия избытка соли и света высокой интенсивности в качестве индуктора накопления астаксантина в клетках *H. pluvialis* на следующем этапе исследования определяли количество непосредственно накопившегося в клетках водоросли астаксантина.

В исходной культуре (начало эксперимента) были зарегистрированы следовые количества астаксантина. В клетках культуры гематококка, выращенной на среде Рудика при обычной интенсивности света, через 21 сут регистрировали увеличение содержания астаксантина – как транс-изомеров, так и 9-цис- и 13-цис-изомеров (рис. 3). Причем содержание всех форм астаксантина было бóльшим в вариантах опыта на обычной среде Рудика по сравнению с вариантами на среде Рудика с избытком NaCl вне зависимости от интенсивности освещения. Так, приняв значения содержания астаксантина (в отн. ед. на клетку) в вариантах на среде Рудика и действии нормального света за 100 %, общее содержание астаксантина в таком же варианте на свету высокой интенсивности составило 225 %, в варианте на нормальном свете с избытком соли – 88, в варианте с избытком соли на свету высокой интенсивности – 187 %. Таким образом, избыток соли в условиях интенсивного освещения культуры гематококка не приводил к увеличению содержания астаксантина по сравнению с культурой на нормальной среде Рудика в таких условиях. Интересно, что соотношение транс-/цис-изомеров астаксантина при увеличении интенсивности света снижалось на 5 и 19 % в вариантах на нормальной среде и среде с избытком соли соответственно. По-видимому, избыток NaCl способствовал усилению транс-/цис-изомеризации астак-

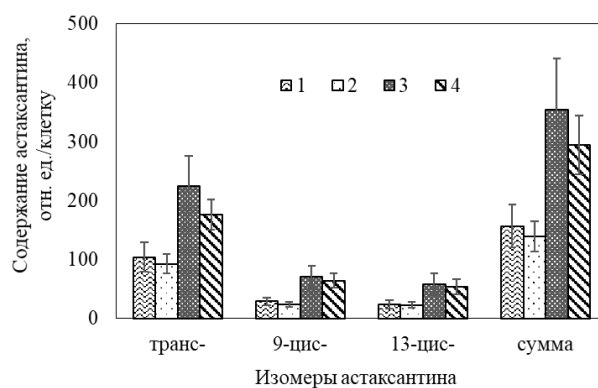


Рис. 3. Количество астаксантина в клетках *H. pluvialis* через 21 сут эксперимента на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) при освещенности 2000 лк (1, 2) и 10 000 лк (3, 4)

Fig. 3. Content of astaxanthin in *H. pluvialis* cells after 21 days of the experiment in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) at illumination of 2000 lx (1, 2) and 10 000 lx (3, 4)

сантина, которая обычно наблюдается в условиях действия света высокой интенсивности либо высокой температуры [21, 22]. Несмотря на меньшее суммарное количество астаксантина при совместном действии света и NaCl, увеличение доли цис-изомеров в указанных условиях является преимуществом такого метода индукции накопления астаксантина, так как по целому ряду биотехнологически значимых свойств цис-астаксантин превосходит транс-астаксантин. Так, цис-астаксантин характеризуется более сильной антиоксидантной активностью и противовоспалительным эффектом, большей биодоступностью и экстрагируемостью [22–25].

Результаты исследования уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих ферменты биосинтеза астаксантина – фитоинсинтазу и β-каротингидроксилазу соответственно, в клетках *H. pluvialis* при совместном действии света высокой интенсивности и избытка NaCl в среде культивирования в культуре водоросли, выращенной в указанных условиях в течение 7 сут, приведены в табл. 2.

Катализируемая фитоинсинтазой конденсация двух молекул геранилгеранилпирофосфата с образованием фитоина может являться лимитирующей стадией биосинтеза каротиноидов, поскольку это первая реакция, характерная исключительно для пути синтеза данных соединений. Фитоинсинтаза – это ассоциированный с мембраной белок, для функционирования которого важны ионы двухвалентных металлов. Он кодируется ядерным геномом и имеет пластидную сигнальную последовательность, которая содержит фрагмент, отвечающий за взаимодействие с другими белками биосинтеза каротиноидов [26, 27].

β-Каротингидроксилаза осуществляет одну из реакций превращения β-каротина в астаксантин – реакцию присоединения гидроксигруппы после образования кетогруппы в β-иононовом кольце. Есть сведения, что регуляция синтеза астаксантина у гематококка может контролироваться путем изменения уровня экспрессии гена β-каротингидроксилазы [27].

Т а б л и ц а 2. Относительная нормализованная экспрессия генов фитоинсинтазы и β-каротингидроксилазы (отн. ед.) в клетках *H. pluvialis* на стандартной среде Рудика (1, 3) и среде Рудика с избытком NaCl (2, 4) после инкубации в течение 7 сут на нормальном свете (2000 лк, варианты 1 и 2) и на свете высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Table 2. Relative normalized expression of phytoene synthase and β-carotene hydroxylase genes (rel. units) in *H. pluvialis* cells in standard Rudic medium (1, 3) and in Rudic medium with excess of NaCl (2, 4) after incubation for 7 days under normal light (2000 lx, variants 1 and 2) and under high-intensity light (10,000 lx, variants 3 and 4)

Вариант	<i>PSY</i>	<i>CHY</i>
Начальная культура	0,093 (100)	0,617 (100)
1	1,961 (2108)	0,718 (116)
2	0,973 (1046)	3,000 (486)
3	0,596 (640)	0,299 (48)
4	0,097 (104)	1,391 (225)

Примечание. В скобках указан процент к контролю.

Данные по уровню экспрессии гена *CHY* на 7-е сутки эксперимента показали заметное превышение исходного значения в вариантах опыта с избытком NaCl, причем наибольшая экспрессия данного гена была выявлена на нормальном свете.

Экспрессия *PSY* повышалась во всех вариантах опыта. В вариантах на нормальном свете она значительно превышала начальную. Так, в контрольном варианте (выращивание на обычной среде Рудика) уровень экспрессии этого фермента превышал опытный вариант (среда с избытком NaCl) более чем в 2 раза (варианты 1 и 2 соответственно). Подобные результаты получены для вариантов на ярком свете, однако в этом случае регистрировалось превышение уже в 6 раз (варианты 3, 4).

Таким образом, экспрессия ключевых генов каротиногенеза усиливается по мере культивирования культуры на свете нормальной интенсивности. В то же время эффект избытка NaCl в питательной среде оказывается различным для генов фитоинсинтазы и β-каротингидроксилазы –

он приводит к ослаблению экспрессии *PSY* и к усилению экспрессии *CHY*. Снижение экспрессии *PSY* может быть лимитирующим фактором, определяющим снижение выхода астаксантина при засолении.

Заключение. Установлено, что избыток NaCl в среде культивирования *H. pluvialis*, инициированный на стадии покоя водоросли, не является эффективным стрессовым фактором в сочетании с действием света высокой интенсивности для индукции накопления астаксантина в клетках *H. pluvialis*. При этом важно отметить, что количество астаксантина в клетках водоросли при избытке NaCl было несколько ниже, чем в вариантах с использованием стандартной среды Рудика независимо от интенсивности освещения. Несмотря на положительное влияние избытка NaCl на экспрессию одного из ключевых генов пути биосинтеза астаксантина, кодирующего β -каротингидроксилазу, в таких условиях наблюдалось ослабление экспрессии гена фитинсинтазы – фермента, катализирующего один из начальных этапов всего каротиногенеза в целом, с чем, по-видимому, и связан низкий выход астаксантина в вариантах опыта, когда водоросли культивировали на среде Рудика с избытком NaCl. В то же время повышение доли цис-изомеров (обладающих большей хозяйственной ценностью, чем транс-изомеры) в общем пуле астаксантина в клетках *H. pluvialis* в условиях совместного действия света высокой интенсивности и избытка NaCl в питательной среде указывает на целесообразность дальнейшей модификации данного метода индукции накопления астаксантина с целью повышения его выхода.

Благодарности. Работа финансирована в рамках Государственной программы научных исследований «Биотехнологии» (задание 1.42, 2019–2020 гг.).

Acknowledgements. This work was supported by the State Program of Scientific Research “Biotechnologies” (grant 1.42, 2019–2020).

Список использованных источников

1. Astaxanthin, a carotenoid with potential human health and nutrition / G. Hussein [et al.] // J. Nat. Prod. – 2006. – Vol. 69, N 3. – P. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>
2. Lorenz, R. T. Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin / R. T. Lorenz, G. R. Cysewski // Trends Biotechnol. – 2000. – Vol. 18, N 4. – P. 160–167. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01433-5)
3. Naguib, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids / Y. M. A. Naguib // J. Agr. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, N 4. – P. 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
4. del Campo, J. A. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives / J. A. del Campo, M. García-González, M. G. Guerrero // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 74, N 6. – P. 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
5. Spiller, G. A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial / G. A. Spiller, A. Dewell // J. Med. Food. – 2003. – Vol. 6, N 1. – P. 51–56. <https://doi.org/10.1089/109662003765184741>
6. Our history [Electronic resource] // AstaReal. – Mode of access: <https://www.astareal.com/en/history/>. – Date of access: 20.04.2021.
7. Cyanotech – Whole Health through Hawaiian microalgae [Electronic resource] // Cyanotech. – Mode of access: www.cyanotech.com. – Date of access: 20.04.2021.
8. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс / Г. С. Минюк [и др.] // Мор. экол. журн. – 2008. – Т. 7, № 2. – С. 5–23.
9. Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project / A. S. Carlsson [et al.]. – Chippenham : CPL Press, 2007. – 86 p.
10. Commercial applications of microalgae / P. Spolaore [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – Vol. 101, N 2. – P. 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
11. Влияние NaCl на продуктивность водоросли *Haematococcus pluvialis* и содержание в ее клетках фотосинтетических пигментов, активных форм кислорода и астаксантина / Н. Г. Аверина [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 263–275.
12. Печенкина, Е. И. Влияние фотосенсибилизатора бенгальского розового на продуктивность и пигментный состав *Haematococcus pluvialis* / Е. И. Печенкина, Т. В. Самович, Н. В. Козел // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2021. – № 1. – С. 58–69.
13. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2011. – 101 с.
14. Rudic, V. Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow) / V. Rudic, T. Dudnicenco. – 2000. – MD Patent Nr. a 2000 0154.
15. Rodriguez-Amaya, D. B. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis / D. B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura. – Washington : HarvestPlus, 2004. – 63 p.
16. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies / S. V. Milenković [et al.] // Adv. Technol. – 2012. – Vol. 1. – P. 16–24.

17. Forni, E. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas / E. Forni, M. Ghezzi, A. Polesello // *Chromatography*. – 2012. – Vol. 26. – P. 120–124. <https://doi.org/10.1007/BF02268135>
18. Yuan, J.-P. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification / J.-P. Yuan, F. Chen // *J. Agr. Food Chem.* – 1999. – Vol. 47, N 1. – P. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
19. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25, N 4. – P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Kakizono, T. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis* / T. Kakizono, M. Kobayashi, S. Nagai // *J. Ferment. Bioeng.* – 1992. – Vol. 74, N 6. – P. 403–405. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90041-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90041-R)
21. Lerfall, J. Effect of high pressure processing on astaxanthin stability / J. Lerfall, S. Birkeland // *Int. J. Food Sci. Tech.* – 2014. – Vol. 49, N 1. – P. 294–297. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12271>
22. Efficient and environmentally friendly method for carotenoid extraction from *Paracoccus carotinifaciens* utilizing naturally occurring Z-isomerization-accelerating catalysts / M. Honda [et al.] // *Process Biochem.* – 2019. – Vol. 89. – P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.005>
23. Rapid and efficient conversion of all-E-astaxanthin to 9Z- and 13Z-isomers and assessment of their stability and antioxidant activities / C. Yang [et al.] // *J. Agr. Food Chem.* – 2017. – Vol. 65, N 4. – P. 818–826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04962>
24. Anti-inflammatory effects of different astaxanthin isomers and the roles of lipid transporters in the cellular transport of astaxanthin isomers in Caco-2 cell monolayers / C. Yang [et al.] // *J. Agr. Food Chem.* – 2019. – Vol. 67, N 22. – P. 6222–6231. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02102>
25. Improved carotenoid processing with sustainable solvents utilizing z-isomerization-induced alteration in physico-chemical properties: a review and future directions / M. Honda [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, N 11. – P. 2149. <https://doi.org/10.3390/molecules24112149>
26. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) / Y. Li [et al.] // *J. Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 165, N 17. – P. 1783–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>
27. Steinbrenner, J. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis* / J. Steinbrenner, H. Linden // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 125, N 2. – P. 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>

References

1. Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 2008, vol. 69, no. 3, pp. 443–449. <https://doi.org/10.1021/np050354+>
2. Lorenz R. T., Cysewski G. R. Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 2000, vol. 18, no. 4, pp. 160–167. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(00)01433-5)
3. Naguib Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, vol. 48, no. 4, pp. 1150–1154. <https://doi.org/10.1021/jf991106k>
4. del Campo J. A., García-González M., Guerrero M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 74, no. 6, pp. 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
5. Spiller G. A., Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of Medicinal Food*, 2003, vol. 6, no. 1, pp. 51–56. <https://doi.org/10.1089/109662003765184741>
6. *Our history (2021)*. Available at: <https://www.astareal.com/en/history/> (accessed 20.04.2021).
7. Cyanotech – Whole Health through Hawaiian microalgae (2021). Available at: <http://www.cyanotech.com> (accessed 20.04.2021).
8. Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Chubchikova I. N., Terent'eva N. V. Unicellular algae as a renewable resource. *Morskoi ekologicheskii zhurnal* [Marine ecological journal], 2008, vol. 7, no. 2, pp. 5–23 (in Russian).
9. Carlsson A. S., van Beilen J. B., Möller R., Clayton D. *Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. outputs from epobio project*. Chippenham, CPL Press, 2007. 86 p.
10. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, vol. 101, no. 2, pp. 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
11. Averina N. G., Kozel N. V., Shcherbakov R. A., Radyuk M. S., Manankina E. E., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Effect of NaCl on *Haematococcus pluvialis* productivity and content in its cells of photosynthetic pigments, active oxygen forms and astaxanthin. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 263–275 (in Russian).
12. Pechenkina E. I., Samovich T. V., Kozel N. V. The influence of Rose Bengal photosensitizer on the productivity and pigment composition of *Haematococcus pluvialis*. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya* [Journal of the Belarusian State University. Biology], 2021, no. 1, pp. 58–69 (in Russian).
13. Melnikov S. S., Manankina E. E., Budakova E. A., Shalygo N. V. *Catalogue of the genetic fund of economically useful algae species*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2011. 101 p. (in Russian).
14. Rudic V., Dudnicenco T. *Process for cultivation of green alga Haematococcus pluvialis (Flotow)*. 2000. MD Patent Nr. a 2000 0154.

15. Rodriguez-Amaya D. B., Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington, HarvestPlus, 2004. 63 p.
16. Milenković S. V., Zvezdanović J. B., Anđelković T. D., Marković D. Z. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced Technologies*, 2012, vol. 1, pp. 16–24.
17. Forni E., Ghezzi M., Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*, 2012, vol. 26, pp. 120–124. <https://doi.org/10.1007/BF02268135>
18. Yuan J.-P., Chen F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 1, pp. 31–35. <https://doi.org/10.1021/jf980465x>
19. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
20. Kakizono T., Kobayashi M., Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1992, vol. 74, no. 6, pp. 403–405. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90041-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90041-R)
21. Lerfall J., Birkeland S. Effect of high pressure processing on astaxanthin stability. *International Journal of Food Science and Technology*, 2014, vol. 49, no. 1, pp. 294–297. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12271>
22. Honda M., Kageyama H., Hibino T., Sowa T., Kawashima Y. Efficient and environmentally friendly method for carotenoid extraction from *Paracoccus carotinifaciens* utilizing naturally occurring Z-isomerization-accelerating catalysts. *Process Biochemistry*, 2019, vol. 89, pp. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.005>
23. Yang C., Zhang L., Zhang H., Sun Q., Liu R., Li J., Wu L., Tsao R. Rapid and efficient conversion of all-E-astaxanthin to 9Z- and 13Z-isomers and assessment of their stability and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, vol. 65, no. 4, pp. 818–826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04962>
24. Yang C., Hassan Y. I., Liu R., Zhang H., Chen Y., Zhang L., Tsao R. Anti-Inflammatory Effects of different astaxanthin isomers and the roles of lipid transporters in the cellular transport of astaxanthin isomers in Caco-2 cell monolayers. *Agricultural and Food Chemistry*, 2019, vol. 67, no. 22, pp. 6222–6231. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02102>
25. Honda M., Kageyama H., Hibino T., Zhang Y., Diono W., Kanda H., Yamaguchi R., Takemura R., Fukaya T., Goto M. Improved carotenoid processing with sustainable solvents utilizing Z-isomerization-induced alteration in physicochemical properties: a review and future directions. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 11, p. 2149. <https://doi.org/10.3390/molecules24112149>
26. Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q. Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Plant Physiology*, 2008, vol. 165, no. 17, pp. 1783–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.12.007>
27. Steinbrenner J., Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*, 2001, vol. 125, no. 2, pp. 810–817. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.810>

Информация об авторах

Самович Татьяна Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: samovich77@gmail.com

Вязов Евгений Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yauhen.viazau@gmail.com

Гончарик Руслан Геннадьевич – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rusgon@mail.ru

Печёнкина Елизавета Ивановна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: eliza9214504@mail.ru

Козел Николай Владимирович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

Information about the authors

Tatsiana V. Samovich – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: samovich77@gmail.com

Yauhen V. Viazau – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yauhen.viazau@gmail.com

Ruslan G. Goncharik – Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rusgon@mail.ru

Elizaveta I. Pechenkina – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eliza9214504@mail.ru

Nikolai V. Kozel – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kozel.mikalai@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 595.384.16:591.9 (282.247.28)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-75-83>

Поступила в редакцию 24.06.2021

Received 24.06.2021

А. В. Алехнович*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь***ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА И ПЛОДОВИТОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ШИРОКОПАЛОГО РАКА (*ASTACUS ASTACUS*) В ВОДОЕМАХ ЗАБРОШЕННЫХ КАРЬЕРОВ**

Аннотация. Изучение популяций широкопалого рака *Astacus astacus* в существующих с 1950–1960-х годов водоемах карьеров старого кирпичного завода Молодечненского района Минской области показало его наличие в 10 из них. Присутствие раков только в замкнутых, не связанных с водотоками карьеров указывает на прямое участие человека по созданию этих популяций. Популяции широкопалого рака в карьерах характеризуются высокой численностью. Средний улов угреловушками составил $1,31 \pm 0,77$ особи на 1 лов.-сут. На первом-втором году жизни раки в карьерах росли быстрее, чем в других местах обитания, но в последующем средние размеры особей в карьере были ниже, чем в целом по Беларуси. Раки старше 6 лет в карьерах не встречались, что указывает на наличие факторов, влияющих на высокую смертность особей старших возрастных групп. В то же время наличие благоприятных условий для роста молоди позволяет популяциям поддерживать их численность на высоком уровне. Причины такого явления неизвестны. Размеры широкопалого рака при достижении им половой зрелости и его плодовитость сопоставимы с таковыми в других местах обитания. В карьере минимальная длина яйценосной самки была 7,2 см. В размерном классе 7,0–7,9 см яйценосных самок было 16,7 %, в размерном классе 8,0–8,9 см – 38,8, в размерном классе 9,0–9,9 см – 70,6 %, в размерном классе 10,0–10,9 см все самки были яйценосными.

Популяции широкопалого рака в водоемах карьеров Молодечненского района следует рассматривать как донорские при проведении работ по интродукции в водоемы бассейна р. Неман.

Ключевые слова: широкопалый рак, рост, плодовитость, замкнутые карьеры, продолжительность жизни

Для цитирования: Алехнович, А. В. Возрастная структура и плодовитость популяций широкопалого рака (*Astacus astacus*) в водоемах заброшенных карьеров / А. В. Алехнович // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 75–83. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-75-83>

Anatoly V. Alekhnovich*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus***AGE STRUCTURE AND FECUNDITY OF THE NOBLE CRAYFISH POPULATIONS IN ABANDONED QUARRIES**

Abstract. The population of noble crayfish (*Astacus astacus*) was researched in quarries of an old brick plant in Molodechno district of Minsk region. Rare disappearing noble crayfish was found in 10 closed quarries. The presence of crayfish in closed quarries that are not connected with watercourses indicates that these populations were created by man. The population of noble crayfish in the quarries of an old brick factory is characterized by a high number. The average catch by eel traps was 1.31 ± 0.77 individuals/trap/day. Crayfish in the first and second year of life grew faster in quarries than in other habitats, but subsequently the average size of individuals in the quarry was smaller in comparison with the general model of noble crayfish growth in Belarus. Individuals that were older than 6 years have not been found in quarries. This indicates that there are factors that determine high mortality rate in older age groups. However, favorable conditions for the growth of juveniles allow the population to maintain their numbers at a high level. The reason for this phenomenon remains unknown. The size of noble crayfish individuals reaching puberty and the fertility is comparable to those from other habitats. In the quarry, the minimum length of an oviparous female was 7.2 cm. Egg-laying females in the 7.0–7.9 cm size class were 16.7 %, in the 8.0–8.9 cm size class – 38.8, in the 9.0–9.9 cm size class – 70.6 %, in the size class of 10.0–10.9 cm all the females were oviparous.

The population of noble crayfish from the quarries of Molodechno district should be considered as donor population for carrying out resettlement into the water bodies of the river Neman.

Keywords: noble crayfish, growth, fecundity, closed quarries, lifespan

For citation: Alekhnovich A. V. Age structure and fecundity of the noble crayfish populations in abandoned quarries. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 75–83 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-75-83>

Введение. В Беларуси широкопалый рак *Astacus astacus* был внесен в первое (1981 г.), второе (1993 г.), третье (2004 г.) и четвертое (2015 г.) издания Красной книги Республики Беларусь [1]. В первом издании этот вид имел I категорию, во втором и последующих изданиях – III категорию национальной природоохранной значимости. Оценка риска вымирания этого вида была снижена в первую очередь из-за расширения наших знаний о численности и распространении этого вида в Беларуси. В настоящее время широкопалый рак в Беларуси характеризуется как уязвимый вид.

В Международной красной книге [2] *A. astacus* классифицируется как уязвимый вид, а в европейских странах рассматривается как самый важный вид раков с точки зрения сохранения его естественных местообитаний и запасов, а также использования в аквакультуре.

Численность широкопалого рака снижается как во всех странах Европы, так и в Беларуси. Причинами этого являются разрушение местообитаний и загрязнение водоемов, а также интродукция американских видов раков, которые угрожают аборигенному широкопалому раку через межвидовую конкуренцию и распространение инфекционных заболеваний [3].

В водоемах Беларуси уже не обнаруживаются популяции широкопалого рака в бассейне р. Припять, очень редок этот вид и для бассейна р. Неман. В то же время он все еще встречается в водоемах бассейнов рек Западная Двина и Днепр.

На фоне общего снижения численности вида наличие многочисленных популяций широкопалого рака в карьерах Молодечненского района Минской области является уникальным явлением. Карьеры были образованы в результате добычи глины во время работы кирпичного завода в 1950–1960-е годы, но уже в 1970-е годы завод прекратил свое существование и карьеры естественным путем были заполнены водой.

Широкопалый рак, очевидно, был вселен в карьеры человеком. В настоящее время в водных объектах Молодечненского района широкопалый рак встречается исключительно в техногенных карьерах и не обнаружен в естественных водных объектах.

Цель работы – проанализировать размерно-возрастную структуру, оценить плодовитость широкопалого рака в водоемах карьеров Молодечненского района Минской области.

Материалы и методы исследования. Работы проводились в карьерах Молодечненского района Минской области.

Общая характеристика карьеров. В районе исследований было установлено 18 карьеров возраста порядка 50–70 лет. Всего обследовано 10 карьеров (рис. 1), площадь которых составляла от 0,278 до 18,275 га. В каждом из них обнаружен широкопалый рак. Основные сборы полевого материала проведены на карьере № 1.

В период работы завода карьеры соединялись трубами в единое целое. Но в настоящее время проходящая асфальтированная дорога делит карьеры на две неравные части, в которых карьеры соединены между собой трубами. В период высокой воды раки могут перемещаться из одного водоема в другой.

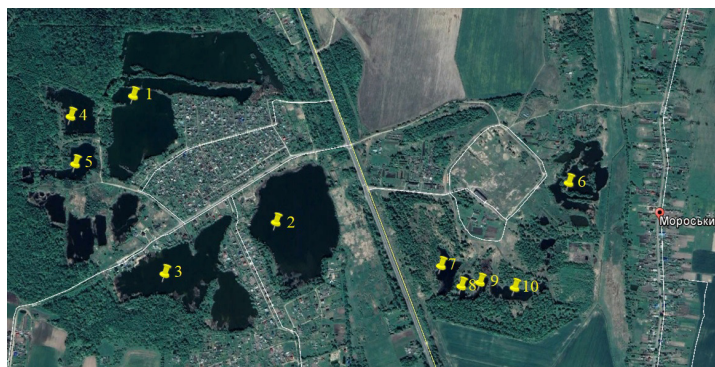


Рис. 1. Места сбора проб по изучению широкопалого рака в карьерах старого кирпичного завода у д. Мороськи Молодечненского района Минской области

Fig. 1. Sampling sites for the spread of noble crayfish in the quarries of an old brick factory near the village of Moroski, Molodechno district

Карьеры характеризуются различной глубиной, преимущественная глубина – 3–4 м, но есть и глубиной до 20 м. В силу специфики береговой линии в большинстве карьеров нет мелководий, но несколько больших водоемов, в том числе и карьер №1, имеют достаточно обширные мелководья. По берегам карьеров и особенно карьеров № 1–5 расположены дачные кооперативы.

Химический состав воды карьера № 1 по результатам ноябрьских проб 2012 г.: P – 0,24 мг/л, NO₃ – 1,3, Fe – 0,11, NH₄ – 0,62, своб. Cl – 0,07, Ca – 111,0, Mg – 23,0 мг/л.

Содержание биогенов в карьере находится в пределах нормы, характеризующей слабоэвтрофный водоем. На жизнедеятельность раков положительно влияют высокое содержание кальция [4], а также гидрохимические параметры воды в целом.

Карьеры обильно заросли погруженной водной растительностью – рдестами, элодеей, урутью и др. Но надводная растительность в виде тростника, рогоза представлена только в отдельных местах и преимущественно узкой полоской вдоль берегов.

Температура воды в период исследований имела следующие значения: 03–04.XI.2012 – 4–5 °С, 24.IV.2018 – 8–9, 15–16.V.2019 – 12, 16–17.X.2019 – 9–10, 23–25.VIII.2020 – 18–19 °С.

Распространение, размерно-возрастную структуру и плодовитость раков оценивали с помощью угреловушек. Описание ловушек приведено в работе [5].

Ловушки устанавливали в водоемах на глубине от 1 до 5 м, ежедневно просматривали, изымали раков и переставляли на новое место.

Численность раков, пойманных с помощью ловушек, рассчитывали как количество раков на ловушку за сутки.

Для определения возраста раков анализировали кумулятивную функцию распределения размеров выловленных особей и сравнивали ее с показателями нормального распределения, отклонение от которых позволяло выделить отдельные размерные классы и интерпретировать их как возрастные.

Сбор проб по определению плодовитости проводили в середине мая, т. е. в конце периода эмбрионального развития яиц перед выходом личинок (E_{pl}). Снятые с отловленных самок яйца подсчитывали и взвешивали.

Раков измеряли от острия роострума до конца тельсона (TL) и взвешивали с точностью до 0,01 г. Анализ полученных результатов проводили отдельно для самцов и самок.

Для математической обработки использовали программу Statistica 6.0.

Результаты исследования. Уловы раколовков в обследованных карьерах колебались в широких границах – от 0,1 до 6,0 экз/лов.-сут. Для карьера № 1 среднесуточные уловы раколовков для разных лет сбора представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Средние суточные уловы широкопалого рака (инд. ± среднеквадр. отклонение) раколовками разной конструкции в карьере № 1

Table 1. Average daily catches of crayfish (ind. ± standard deviation) from quarry No. 1, caught by traps of different designs

Дата отбора проб	Самцы		Самки	
	Вентеря	Угре-ловушки	Вентеря	Угреловушки
03–04.XI.2012	0,51 ± 0,23	1,06 ± 0,29	0,20 ± 0,05	0,33 ± 0,13
24.IV.2018	–	2,33	–	0,78
15–16.V.2019	6,94 ± 8,57	1,96 ± 0,02	1,33 ± 1,63	0,95 ± 0,12
16–17.X.2019	0,68 ± 0,06	1,93 ± 0,30	0,14 ± 0,11	0,50 ± 0,11
23–25.VIII.2020	1,44 ± 0,51	1,77 ± 0,27	2,17 ± 1,30	2,25 ± 0,78

Средние уловы, рассчитанные для одной ловушки, характеризовались высокой изменчивостью. В смежные дни наблюдений в разных местах карьера уловы могли различаться в 2 раза, вследствие чего в отдельных случаях дисперсия оказывалась выше среднего значения. Для всех периодов наблюдений средний улов угреловушками составил $1,31 \pm 0,77$ особи на 1 лов.-сут.

Во всех случаях наблюдений, за исключением августа, средние уловы самцов превышали средние уловы самок и только в августе уловы самок были выше уловов самцов.

Длина самцов в уловах изменялась от 3,6 до 13,5 см и колебалась в среднем от 9,14 до 11,30 см (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Средние размеры самцов, отловленных в разное время в карьере № 1

Table 2. Average size of males from quarry No. 1, caught in different times

Дата отбора проб	К-во самцов	Длина самцов, см			Дисперсия
		средняя	минимальная	максимальная	
03–04. XI.2012	144	9,21	3,6	12,7	1,53
24.04.2018	84	9,15	6,3	12,4	1,10
15–16.V.2019	181	9,14	6,8	11,8	0,94
16–17.X.2019	138	9,33	6,4	11,3	0,98
23–25.VIII.2020	217	10,14	5,4	12,8	1,10

Длина самок в уловах раколовков изменялась от 5,0 до 10,9 см и колебалась в среднем от 7,72 до 9,35 см (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Средние размеры самок, отловленных в разное время в карьере № 1

Table 3. Average size of females caught in different times in quarry No. 1

Дата отбора проб	К-во самок	Длина самок, см			Дисперсия
		средняя	минимальная	максимальная	
03–04. XI.2012	54	7,72	5,0	10,9	1,35
24.04.2018	28	8,60	7,4	10,7	0,96
15–16.V. 2019	71	8,59	6,9	10,7	0,80
16–17.X.2019	36	8,15	5,2	9,7	0,98
23–25.VIII.2020	282	9,35	7,2	10,9	0,63

Средние размеры как самцов, так и самок, отловленных в 2020 г., достоверно отличались от средних размеров самцов и самок ($p = 0,00$), собранных в другие годы. Во всех остальных случаях сбора материала различий либо не установлено, либо уровень их значимости был низким.

Анализ сборов, проведенных в августе 2020 г., показал достоверное увеличение средних размеров особей в карьере № 1, но в целом размеры особей в карьере были невысокими.

Размерно-весовое соотношение самцов и самок по сборам октября 2019 г. показано на рис. 2, 3.

Зависимость массы самца от длины определяли с помощью уравнения $W = 0,0116TL^{3,4608}$ ($R^2 = 0,9519$).

Зависимость массы самки от длины определяли с помощью уравнения $W = 0,0193TL^{3,1969}$ ($R^2 = 0,9218$).

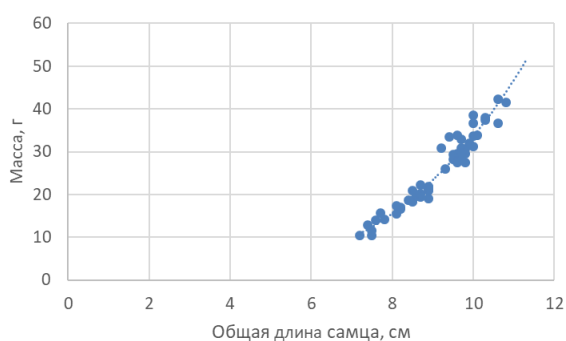


Рис. 2. Зависимость массы самца (W , г) от длины (TL , см) (октябрь 2019 г.)

Fig. 2. Dependence of the mass of males (W , g) on the length (TL , cm) (October 2019)

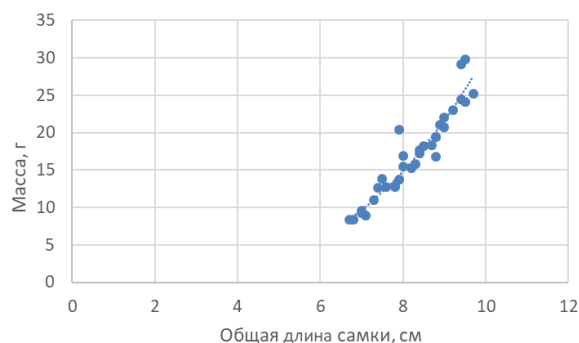


Рис. 3. Зависимость массы самок (W , г) от длины (TL , см) (октябрь 2019 г.)

Fig. 3. Dependence of the mass of females (W , g) on the length (TL , cm) (October 2019)

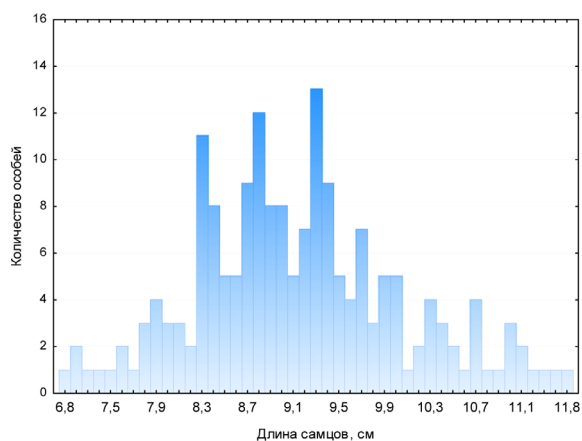


Рис. 4. Размерная структура самцов карьера № 1, собранных 15–16 мая 2019 г.

Fig. 4. Size structure of males from quarry No. 1, collected on May 15–16, 2019

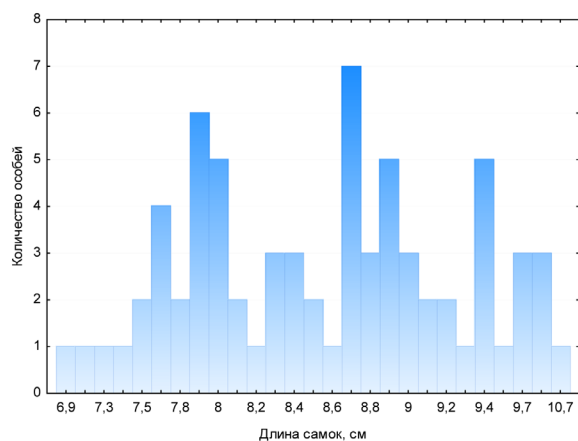


Рис. 5. Размерная структура самок карьера № 1, собранных 15–16 мая 2019 г.

Fig. 5. Size structure of females from quarry No. 1, collected on May 15–16, 2019

У самцов скорость увеличения массы с увеличением длины выше, чем у самок. У самцов с TL 10 см в сравнении с самцами с TL 9 см масса увеличивается на 13,1 г, а у самок таких же размеров – только на 10,8 г.

Для выделения возрастных групп были проанализированы сборы мая 2019 г. (рис. 4, 5) как наиболее многочисленные.

Анализ размерной структуры раков карьера № 1 по выборке мая 2019 г. с использованием вероятностно-статистических методов позволил выделить возрастные группы (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Размерно-возрастная структура широкопалого рака карьера № 1 (май 2019)

T a b l e 4. Size and age structure of noble crayfish career No. 1 (May 2019)

Показатель	Возраст, лет				
	2	3	4	5	6
Длина, см:					
самцы	6,8–7,2	7,4– 8,5	8,6–10,0	10,1–11,2	11,2–11,8
самки	6,9–7,3	7,4– 8,2	8,3–9,0	9,1–9,7	10,3–10,7

С возраста 4 года и больше самки начинают отставать в росте от самцов.

В карьере № 1 минимальная длина яйценосной самки была 7,2 см. В размерном классе 7,0–7,9 см яйценосных самок было 16,7 %, в размерном классе 8,0–8,9 см – 38,8, в размерном классе 9,0–9,9 см – 70,6 %, размерном классе 10,0–10,9 см все самки были яйценосными.

Таким образом, в карьерах половое созревание у широкопалого рака начинается в возрасте 3 года, в возрасте 4 года 2/3 самок несут яйца на плеоподах. Самки в возрасте 5 лет все являются половозрелыми и участвуют в размножении.

Размножение и откладка яиц на плеоподы у самок широкопалого рака в карьерах начинаются с первых чисел ноября, выклев личинок – в начале июня. Самки вынашивают яйца 6–7 мес. В период вынашивания яиц часть их неизбежно по тем или иным причинам теряется. В связи с этим различают овариальную плодовитость – количество яиц, которые отложила самка на плеоподы осенью, и плодовитость перед выходом личинок из яиц.

Плодовитость самок перед выклевом личинок показана на рис. 6.

Зависимость плодовитости самок перед выклевом личинок (F_{pl}) от общей длины самки (TL , см) описывается линейным уравнением $F_{pl} = 26,156TL - 126,08$ ($r = 0,61$, $p = 0,0359$).

Средняя сырая масса одного яйца составила $0,0157 \pm 0,0018$ г. Масса одного яйца увеличивается с увеличением общей длины самки ($t = 0,631$, $p = 0,037$).

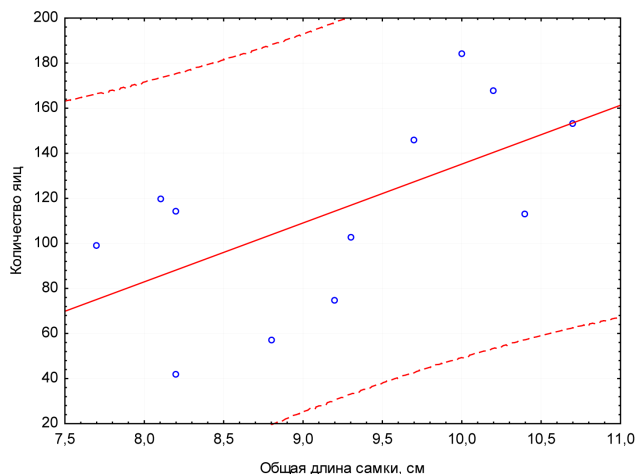


Рис. 6. Плодовитость самок перед выклевом личинок широкопалого рака карьера № 1 в зависимости от их длины (0,95 %-ный доверительный интервал)

Fig. 6. Fertility of noble crayfish female individuals before hatching of larvae from quarry No. 1, depending on their length (0.95 % confidence intervals)

берег карьера № 1 плотно застроен дачными домиками, карьер во все поры года активно используется рыбаками. Широкопалый рак – краснокнижный вид, но, тем не менее, нет сомнений, что люди участвуют в его отлове. Однако ни загрязнения, поступающие в карьер с дачных участков, ни прямой вылов не сказываются катастрофически на популяции раков. За период с 2012 по 2020 г. численность раков даже несколько увеличилась.

Определение возраста раков представляет собой чрезвычайно сложную задачу. В обобщающей сводке по росту раков [6] отмечено, что выделение возрастных групп на основе вероятностно-статистических методов анализа размерной структуры популяции либо путем прямых экспериментальных работ по выращиванию раков известного возраста следует отнести к одним из основных методов. Опыт исследователя, его знания биологии вида в этом отношении играют не последнюю роль.

В карьере № 1 не обнаружено особей старше 6 лет. В работе [7] приводятся значения параметров роста широкопалого рака без учета пола особей (табл. 5).

Т а б л и ц а 5. Размерно-возрастная структура популяции широкопалого рака, полученная по средним для водоемов Беларуси значениям [7]

Table 5. Size-age structure of the population of noble crayfish, obtained from the average values for water bodies of Belarus [7]

Показатель	Возраст, лет							
	2	3	4	5	6	7	8	9
Длина, см	6,34	8,46	10,08	11,33	12,28	13,02	13,58	14,01

В сравнении с обобщенными данными по возрастной структуре широкопалого рака продолжительность жизни раков в карьере № 1 не превышала 6 лет. Очевидно, существуют какие-то факторы, которые увеличивают смертность старших возрастных групп до 100 %.

Вторая особенность роста раков в карьере – это высокая скорость роста молоди. В возрасте 2 года средние размеры раков в карьере выше обобщенной модели, но средние размеры особей в возрасте 3–6 лет уже меньше.

Важной характеристикой жизненного цикла рака являются его возраст и размер при достижении половозрелости. Самки широкопалого рака становятся половозрелыми при длине 70–85 мм [8]. В условиях Литвы самцы достигают половой зрелости на третьем году жизни при длине 70 мм, самки – на четвертом году жизни при длине 80 мм [4]. В водоемах Скандинавии самки

Обсуждение. В карьере № 1 в сравнении с другими местами обитания этого вида в Беларуси численность широкопалого рака одна из наибольших. Уловы на 1 лов.-сут составляют 1,39–4,02 особи. Высокие уловы дают основание рекомендовать популяцию широкопалого рака карьеров как донорскую для расселения и создания новых популяций. Карьеры относятся к бассейну р. Неман, где встречаемость широкопалого рака чрезвычайно низкая [5]. Это многократно повышает значимость популяции широкопалого рака в водоемах карьеров как единственного многочисленного резервата раков в данном бассейне.

Высокая численность раков в карьере указывает на благоприятные условия обитания, несмотря на техногенные изменения ландшафта и высокую антропогенную нагрузку на данный район. Южный и юго-западный

созревают на четвертое лето, самцы – на третье [9]. Минимальная длина половозрелых самок не остается постоянной и варьируется от года к году. Например, в оз. Steinfiord в 1981 г. минимальные размеры половозрелых самок были 78 мм, в 1982 г. – 75, в 1983 г. – 70 мм [10]. Размеры и возраст половозрелости самок широкопалого рака широко варьируются как внутри одной популяции, так и между популяциями. В Норвегии в оз. Вэлерен минимальные размеры половозрелой самки были 62 мм, в реке Глоба – 80 мм [11]. В Финляндии половозрелая самка с яйцами в пруду была длиной 59 мм и массой 7,8 г. Большинство самок больше 70 мм были половозрелыми [12]. Если в Скандинавии широкопалый рак созревает на 4–6-е лето и имеет размеры 60–80 мм, то в экспериментальных условиях при выращивании в аквариумах и температуре 20 ° две самки после 13 мес. выращивания отложили неоплодотворенные яйца. Длина карапакса яйценосных самок – 28,7 и 32,2 мм [13], что соответствует 58 и 65 мм общей длины. Но в целом в естественных местообитаниях (озерах и реках) половозрелыми самки широкопалого рака становятся при длине тела от 62 до 85 мм [15].

В белорусском оз. Каравайно (северная часть Беларуси) минимальные размеры яйценосных самок были 79 мм, в карьере – 72 мм.

Таким образом, учитывая возрастную структуру популяции, можно утверждать, что в карьере № 1 самки начинают созревать в возрасте 2+. В возрасте 3 года доля половозрелых самок составляет 39 %, и только в возрасте 5 лет все самки становятся половозрелыми и ежегодно участвуют в вынашивании яиц. Отметим, что в оз. Каравайно самки в возрасте 3+ все становятся половозрелыми и 95,6 % из них вынашивают яйца на плеоподах [15]. В Финляндии от 54 до 95 % половозрелых самок могут не участвовать ежегодно в размножении [16], в Норвегии этот показатель изменяется в пределах от 8 до 74 % [11]. В условиях Беларуси все половозрелые самки широкопалого рака ежегодно участвуют в размножении и несут яйца на плеоподах.

Весной (перед выклевом личинок) плодовитость одноразмерных самок может колебаться в широких пределах. Так, плодовитость особей длиной 90 мм из озер Финляндии, Норвегии, Дании варьируется от 87 до 154 яиц [14]. В оз. Каравайно плодовитость самок длиной 9,0 см составляет 93 яйца, в карьере № 1 – 109 яиц, т. е. плодовитость примерно одинаковая. В норвежском оз. Steinfiord самки длиной 9,0 см весной имеют плодовитость 120 яиц. В то же время в большинстве случаев различия в плодовитости одноразмерных групп самок широкопалого рака из разных популяций статистически недостоверны [16].

Для анализа возможной зависимости массы одного яйца от размеров или массы самки следует брать яйца в период их откладки на плеоподы. Поскольку в процессе эмбрионального развития сырая масса одного яйца становится больше из-за увеличения процентного содержания воды в яйце, увеличение сырой массы одного яйца с увеличением размеров особи указывает на то, что крупные самки раньше приступают к откладке яиц и, следовательно, их яйца находятся на более поздних стадиях эмбрионального развития.

Заключение. Таким образом, широкопалый рак из карьера № 1 характеризуется высокой численностью и ранним половым созреванием. Плодовитость самок перед выклевом личинок в карьерах сопоставима с плодовитостью вида в других местах обитания. Максимальная продолжительность жизни особей широкопалого рака в карьере составляет всего 6 лет, что указывает на наличие факторов, влияющих на высокую смертность старших возрастных групп. В то же время благоприятные условия роста молоди позволяют популяции поддерживать свою численность на высоком уровне. Популяции широкопалого рака в водоемах карьеров Молодечненского района следует рассматривать как донорские при проведении работ по интродукции в другие водоемы бассейна р. Неман.

Благодарности. Работы по изучению широкопалого рака проведены при поддержке проекта ПРООН-ГЭФ «Устойчивое управление лесными и водно-болотными экосистемами для достижения многоценных преимуществ» («Ветландс»).

Acknowledgements. Works on the study of noble crayfish were carried out with the support of supported by the project UNDP/GEF entitled “Conservation-Oriented Management of Forests and Wetlands to Achieve Multiple Benefits” (“Wetlands”).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алехнович, А. В. Широкопалый рак / А. В. Алехнович // Красная книга Республики Беларусь. Животные: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды диких животных / под ред. И. М. Качановского. – Минск, 2015. – С. 259–260.
2. *Astacus astacus*, Noble Crayfish / L. Edsman [et al.]. // The IUCN Red List of Threatened Species 2010, art. e.T2191A9338388. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T2191A9338388.en>
3. Алехнович, А. В. Речные раки Беларуси в современных условиях: распространение, динамика численности, продукционно-промысловый потенциал / А. В. Алехнович. – Минск : Беларус. навука, 2016. – 303 с.
4. Цукерзис, Я. М. Речные раки / Я. М. Цукерзис ; ред. В. Л. Контримавичюс. – Вильнюс : Моксклас, 1989. – 142 с.
5. Алехнович, А. В. Современное распространение речных раков (Decapoda: Astacidae, Cambaridae) в водоемах бассейна реки Неман на территории Беларуси / А. В. Алехнович, Д. В. Молотков, К. Сливинска // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 2. – С. 182–190.
6. Reynolds, J. D. Growth and reproduction / J. D. Reynolds // *Biology of freshwater crayfish* / ed. D. M. Holdich. – Oxford, 2002. – P. 152–191.
7. Алехнович, А. В. Параметры уравнений группового роста в популяциях широкопалого рака *Astacus astacus* / А. В. Алехнович // Вестн. БГУ. Сер. 2: Химия. Биология. География. – 2016. – № 1. – С. 20–25.
8. Skurdal, J. Size and sex composition of noble crayfish *Astacus astacus* L. in trap catches in lake Steinsfjorden / J. Skurdal, T. Qvenild, T. Taugbol // *Freshwater Crayfish*. – 1995. – Vol. 8. – P. 249–256.
9. Ackefors, H. Observations on the yearly life cycle of *Astacus astacus* in a small lake in Sweden / H. Ackefors // *Freshwater Crayfish*. – 1999. – Vol. 12. – P. 413–429.
10. Skurdal, J. Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S. E. Norway / J. Skurdal, T. Qvenild // *Freshwater Crayfish*. – 1986. – Vol. 6. – P. 182–186.
11. Taugbol, T. Maturity and fecundity of *Astacus astacus* females in Norway / T. Taugbol, J. Skurdal, E. Fjeld // *Freshwater Crayfish*. – 1988. – Vol. 7. – P. 107–114.
12. Tulonen, J. Growth rate, survival and reproduction of noble crayfish (*Astacus astacus* (L.)) and signal (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)) under similar rearing conditions / J. Tulonen, E. Erkamo, J. Kirjavainen // *Freshwater Crayfish*. – 1995. – Vol. 10. – P. 623–629.
13. Moulting, growth, survival and color of crayfish *Astacus astacus* (L.) juveniles fed diets with and without green plant material and maintained in individual cages and communal tanks / P. Henttonen [et al.]. // *Freshwater Crayfish*. – 1993. – Vol. 9. – P. 426–441.
14. Skurdal, J. Do we need harvest regulations for European crayfish? / J. Skurdal, T. Taugbøl // *Rev. Fish Biol. Fish.* – 1994. – Vol. 4. – P. 461–485. <https://doi.org/10.1007/bf00042890>
15. Алехнович, А. В. Мониторинг популяции широкопалого рака *Astacus astacus* (L.) в озере Каравайно, Беларусь / А. В. Алехнович, В. М. Байчоров, В. Ф. Кулеш // Вес. БДПУ. Сер. 3. Фізика. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія. – 2011. – № 1. – С. 17–25.
16. Savolainen, R. Fecundity of finnish noble crayfish, *Astacus astacus* L., and signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in various natural habitats and in culture / R. Savolainen, K. Westman, M. Pursiainen // *Freshwater Crayfish*. – 1996. – Vol. 11. – P. 319–338.

References

1. Alekhovich A. V. The noble crayfish. Red Book of the Republic of Belarus. Rare and endangered species of wild animals. Minsk, 2015, pp. 259–260 (in Russian).
2. Edsman L., Füreder L., Gherard, F., Souty-Grosset C. *Astacus astacus*. Noble Crayfish. The IUCN Red List of Threatened Species 2010, art. e.T2191A9338388. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-3.RLTS.T2191A9338388.en>
3. Alekhovich A. V. Freshwater crayfish in Belarus in modern conditions: distribution, population dynamics, production and fishing potential. Minsk, Belaruskaya nauka Publ., 2016. 303 p. (in Russian).
4. Tsukerzys Ya. M. *River crayfish*. Vilnius, Moksklas Publ., 1989. 142 p. (in Russian).
5. Alekhovich A. V., Molotkov D. V., Slivinska K. The current distribution of the freshwater crayfish (Decapoda: Astacidae, Cambaridae) in the Neman River basin in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 2, pp. 182–190 (in Russian).
6. Reynolds J. D. Growth and reproduction. *Biology of Freshwater crayfish*. Oxford, 2002, pp. 152–191.
7. Alekhovich A. V. Parameters of group growth equations in populations of noble crayfish *Astacus astacus*. *Vestnik BGU. Seriya 2: Khimiya. Biologiya. Geografiya* [BSU Bulletin. Series 2: Chemistry. Biology. Geography], 2016, no. 1, pp. 20–25 (in Russian).
8. Skurdal J., Qvenild T., Taugbol T. Size and sex composition of noble crayfish *Astacus astacus* L. in trap catches in lake Steinsfjorden. S. E. Norway: effect of exploitation. *Freshwater Crayfish*, 1995, vol. 8, pp. 249–256.
9. Ackefors H. Observations on the yearly life cycle of *Astacus astacus* in a small lake in Sweden. *Freshwater Crayfish*, 1999, vol. 12, pp. 413–429.
10. Skurdal J., Qvenild T. Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden. S. E. *Freshwater Crayfish*, 1986, vol. 6, pp. 182–186.

11. Taugbol T., Skurdal J., Fjeld E. Maturity and fecundity of *Astacus astacus* females in Norway. *Freshwater Crayfish*, 1988, vol. 7, pp. 107–114.
12. Tulonen J., Erkamo E., Kirjavainen J. Growth rate, survival and reproduction of noble crayfish (*Astacus astacus* (L.)) and signal (*Pacifastacus leniusculus* (Dana)) under similar rearing conditions. *Freshwater Crayfish*, 1995, vol. 10, pp. 623–629.
13. Henttonen P., Huner J. V., Lindqvist O. V., Henttonen L., Pitkanien J. Moulting, growth, survival and color of crayfish *Astacus astacus* (L.) juveniles fed diets with and without green plant material and maintained in individual cages and communal tanks. *Freshwater Crayfish*, 1993, vol. 9, pp. 426–441.
14. Skurdal J., Taugbøl T. Do we need harvest regulations for European crayfish? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1994, vol. 4, pp. 461–485. <https://doi.org/10.1007/bf00042890>
15. Alekhovich A. V., Baytchorov V. M., Kulesh V. F. Monitoring the population of noble crayfish *Astacus astacus* (L.) in Lake Karavaino, Belarus. *Vesti BDPU. Seriya 3. Fizika. Matematika. Infarmatyka. Biyalogiya. Geagrafiya* [Proceedings of BSPU. Series 3. Physics. Mathematics. Informatics. Biology. Geography.], 2011, no. 1, pp. 17–25 (in Russian).
16. Savolainen R., Westman K., Pursiainen M. Fecundity of finnish noble crayfish, *Astacus astacus* L., and signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in various natural habitats and in culture. *Freshwater Crayfish*, 1996, vol. 11, pp. 319–338.

Информация об авторе

Алехнович Анатолий Васильевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Alekhovichav@gmail.com

Information about the author

Anatoly V. Alekhovich – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Alekhovichav@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 574.472
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-84-90>

Поступила в редакцию 09.08.2021
Received 09.08.2021

Е. И. Федосенко

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

СТРУКТУРА И СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПАУКОВ В СОСНЯКАХ ЧЕРНИЧНЫХ И МШИСТЫХ ЗАКАЗНИКА «ПРИБУЖСКОЕ ПОЛЕСЬЕ»

Аннотация. Целью работы являлось установление структуры видовой разнообразия пауков в сосняках черничных и мшистых республиканского заказника «Прибужское Полесье» и ее сравнительный анализ в разрезе сезонной динамики. В сосняке черничном выявлен 51 вид, в сосняке мшистом – 52. Всего обнаружен 71 вид из 17 семейств, впервые указаны для территории заказника 53 вида, для Беларуси – 1. Исследования показали, что видовое разнообразие пауков имеет сходную структуру, что подтверждают результаты расчета индексов Шеннона, Пielу, а также индексов доминирования Симпсона, Маргалефа. В сосняке черничном выше численность особей и их динамическая плотность, тогда как в сосняке мшистом – выравненность и видовое богатство. Доминирующим видом в сосняке мшистом являлся *Trochosa terricola* (относительное обилие 25,0 %), в сосняке черничном доминировали *Alopecosa aculeata* и *T. terricola* (30,3 и 23,5 % соответственно).

Ключевые слова: пауки, заказник «Прибужское Полесье», индексы видовой разнообразия, сосновые леса

Для цитирования: Федосенко, Е. И. Структура и сезонная динамика видовой разнообразия пауков в сосняках черничных и мшистых заказника «Прибужское Полесье» / Е. И. Федосенко // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 84–90. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-84-90>

Elena I. Fedosenko

Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus

STRUCTURE AND SEASONAL DYNAMICS OF DIVERSITY OF SPIDERS IN THE BILBERRY AND MOSSY PINE FORESTS OF THE RESERVE “PRIBUZHSKOYE POLESIE”

Abstract. The article describes the structure and seasonal dynamics of spider species diversity in bilberry and mossy pine forest in the republican reserve “Pribuzhskoye Polesie”. 51 species had been registered in the bilberry pine forest and 52 species in the mossy pine forest. In total, 71 species which belong to 17 families had been registered. 53 new species for the territory of the reserve and one new species for Belarus are indicated. Studies have shown that the species diversity of spiders has a similar structure, which is confirmed by the results of calculating the Shannon, Pielu, Simpson and Margalef indices. In the bilberry pine forest, the number of individuals and the dynamic density are higher, while in the mossy pine forest there is evenness and species richness. The dominant species in the mossy pine forest is *Trochosa terricola* (relative abundance 25.0 %), in the bilberry pine forest there are two dominants – *Alopecosa aculeata* and *T. terricola* (30.3 and 23.5 %, respectively).

Keywords: spiders, reserve “Pribuzhskoye Polesie”, species diversity indices, pine forest

For citation: Fedosenko E. I. Structure and seasonal dynamics of diversity of spiders in the bilberry and mossy pine forests of the reserve “Pribuzhskoye Polesie”. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 84–90 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-84-90>

Введение. Трансграничный биосферный резерват «Прибужское Полесье» расположен на юго-западе Брестского района Республики Беларусь. Его ядром является Республиканский заказник «Прибужское Полесье», который был основан в 2003 г. Резерват «Прибужское Полесье» получил официальный статус биосферного резервата ЮНЕСКО в 2004 г., а в 2012 г. его официальный статус был подтвержден на международном уровне как трансграничного трехстороннего биосферного резервата «Западное Полесье». С польской стороны в резерват включен Полесский национальный парк, с украинской – Шацкий национальный природный парк [1].

Заказник расположен в Голарктическом флористическом царстве, в циркумбореальной флористической области. Относится к Голарктической фаунистической области в Царстве Арктогея. Расположен в южной части лесной зоны, в подзоне широколиственных и смешанных лесов, входящих в зону умеренных и субарктических широколиственных лесов или редколесий [3].

Географическое положение этой охраняемой территории довольно своеобразно. Это один из самых удаленных на юго-запад заказников Беларуси, максимально приближенный одновременно к европейско-атлантическим и средиземноморско-понтическим биотам. Экосистемное своеобразие территории во многом обусловлено также тем, что по признаку частоты расчленения рельефа ее северная часть во всем Белорусском Полесье уступает только Мозырскому Полесью и Правобережью Днестра [3].

Ландшафтный заказник «Прибужское Полесье» расположен в долине р. Западный Буг на преимущественно плоских местоположениях водоразделов небольших притоков Буга в западной части Полесья. Его территория является частью Малоритской водно-ледниковой равнины, являющейся в свою очередь составной частью обширной Волынской зандровой равнины. В границах территории выделяются ландшафты полого-волнистой моренной равнины и плоско-волнистой водно-ледниковой равнины (который абсолютно преобладает), пойменной и надпойменной террас, а также аквальные ландшафты [3].

На этой территории выявлены редкие для региона виды ландшафтных урочищ, интересные геоморфологические объекты – дюны, комплексы верховых и переходных болот, небольшие лесные озера. Наибольшее превышение над уровнем моря составляет 182,6 м, наименьшее – 142,3 м [3].

Пауки являются характерными обитателями лесов. Они относятся к обязательным компонентам животного населения лесных экосистем. Высокая численность, большая плодовитость и специфика их питания, выражающаяся в облигатной зоофагии, дает основание считать, что они играют важную роль в биогеоценозах различных типов. Значение паукообразных переоценить сложно. Они принадлежат к числу важнейших энтомофагов, истребляющих огромное количество насекомых и ограничивают нарастание численности вредных членистоногих, из которых 40–50% являются серьезными вредителями леса [2].

Изучение аранеофауны в данном регионе проводилось на польской и украинской территории. На украинской части заказника пауков изучали в сосновых, смешанных, сосново-грабовых лесах [4] и березняках [5]. Со стороны Беларуси проводились исследования в Томашовском и Домачевском лесничествах в октябре 2020 г. [6]. В весенний период был изучен и описан видовой состав пауков и сенокосцев в сосновых биогеоценозах вышеуказанных лесничеств [7]. Для установления основных характеристик сообществ пауков необходимо их сезонное изучение.

Цель данной работы – анализ структуры и сезонной динамики видового разнообразия пауков в черничных и мшистых сосняках заказника «Прибужское Полесье».

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в сосняках черничных и мшистых на территории заказника «Прибужское Полесье» (Брестский р-н, Домачевское лесничество). Были выбраны сосняки с возрастом древостоев от 52 до 55 лет, II класса бонитета. Сборы проводили на двух участках сосняков. Характеристики сосновых лесов приведены в табл. 1.

Для количественного учета пауков на участках сосняков черничного и мшистого было установлено по 10 почвенных ловушек Барбера [8]. В качестве ловушек использовали пластиковые стаканчики с диаметром отверстия 85 мм и объемом 350 мл, которые на 1/3 заполняли 4 %-ным раствором формалина в качестве фиксатора. Всего за период исследований собрано и обработано 140 ловушек, с марта по октябрь 2020 г. – 4880 ловушко-суток.

Всего в сосняках черничном и мшистом собрано 1517 и 1115 экземпляров пауков соответственно, идентифицирована таксономическая принадлежность взрослых особей: в сосняке черничном – 51 вид из 16 се-

Таблица 1. Характеристики исследуемых сосновых лесов лесничества Домачевское
Table 1. Characteristics of the studied pine forests of the Domachevskoe forestry

Характеристика	Сосняк	
	черничный	мшистый
Квартал	197	197
Выдел	5	11
Состав	7СЗБ + ОС	10С
Возраст, лет	55	52
Бонитет	2	2
Полнота	0,7	0,7
Подлесок	КРЛ, Р, средний	–
Подрост	–	–
Статус ООПТ	Заказник	Заказник

Примечание. ООПТ – особо охраняемые природные территории, С – сосна, Б – береза, ОС – осина, КРЛ – крушина ломкая, Р – рябина.

мейств, в сосняке мшистом – 52 вида из 17 семейств. Неполовозрелых особей в расчет не принимали.

Результаты и их обсуждение. В данных биогеоценозах пауки являются наиболее разнообразной группой эпигейных членистоногих по количеству видов. Список пауков, отмеченных в сосняках черничном и мшистом заказника «Прибужское Полесье», а также относительное обилие каждого вида приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Список пауков сосняков черничного и мшистого заказника «Прибужское Полесье»

Table 2. List of spiders in pine forests of the blueberry and mossy reserve “Pribuzhskoe Polesie”

Семейство	Вид	Относительное обилие, %	
		Сосняк черничный	Сосняк мшистый
Theridiidae	<i>Crustulina guttata</i> (Wider, 1834)	0,20	0,09
	<i>Asagena phalerata</i> (Panzer, 1801) ¹		1,62
	<i>Episinus angulatus</i> (Blackwall, 1836) ¹	0,07	
	<i>Euryopis flavomaculata</i> (C. L. Koch, 1836) ¹	0,07	0,18
	<i>Steatoda bipunctata</i> (Linnaeus, 1758) ¹		0,09
	<i>Pholcomma gibbum</i> (Westring, 1851) ¹	0,13	
Linyphiidae	<i>Abacoproeces saltuum</i> (L. Koch, 1872) ¹	0,99	3,87
	<i>Anguliphantes angulipalpis</i> (Westring, 1851)	0,07	
	<i>Bathyphantes gracilis</i> (Blackwall, 1841) ¹		0,09
	<i>Centromerus brevipalpus</i> (Menge, 1869)	0,59	0,45
	<i>Cnephalocotes obscurus</i> (Blackwall, 184) ¹	0,07	
	<i>Centromerus sylvaticus</i> (Blackwal, 1841)		0,09
	<i>Macrargus carpenteri</i> (O. Pickard-Cambridge, 1894)		0,45
	<i>Pocadicnemis pumila</i> (Blackwall, 1841) ¹		0,81
	<i>Stemonyphantes lineatus</i> (Linnaeus, 1758) ¹		0,27
	<i>Tapinocyba pallens</i> (O. Pickard-Cambridge, 1872)		1,17
	<i>Linyphia triangularis</i> (Clerck, 1757) ¹	0,07	
	<i>Macrargus rufus</i> (Wider, 1834)	0,07	
	<i>Microneta viaria</i> (Blackwall, 1841)	0,20	
	<i>Neriere clathrata</i> (Sundevall, 1830)	0,07	
	<i>Palliduphantes alutacius</i> (Simon, 1884) ¹	0,07	
	<i>Panamomops mengei</i> (Simon, 1926) ¹	0,13	
	<i>Tenuiphantes flavipes</i> (Blackwall, 1854)	0,40	
<i>Walckenaeria cucullata</i> (C. L. Koch, 1836)	1,91	6,12	
<i>Walckenaeria dysderoides</i> (Wider, 1834) ¹		0,09	
Tetragnathidae	<i>Pachygnatha clercki</i> (Sundevall, 1823) ¹		0,09
Araneidae	<i>Araneus diadematus</i> (Clerck, 1757)	0,13	0,36
	<i>Cercidia prominens</i> (Westring, 1851)	0,07	
Lycosidae	<i>Alopecosa aculeata</i> (Clerck, 1757) ¹	30,26	9,17
	<i>Alopecosa taeniata</i> (C. L. Koch, 1835) ¹	0,46	
	<i>Alopecosa pulverulenta</i> (Clerck, 1757) ¹		0,36
	<i>Hygrolycosa rubrofasciata</i> (Ohlert, 1865) ¹		0,09
	<i>Pardosa lugubris</i> (Walckenaer, 1802) ¹	4,61	9,35
	<i>Pardosa saltans</i> (Töpfer-Hofmann, 2000) ¹	0,99	0,81
	<i>Tricca lutetiana</i> (Simon, 1876) ¹	0,73	0,63
	<i>Trochosa spinipalpis</i> (F. O. P.-Cambridge, 1895) ¹	0,07	
	<i>Trochosa terricola</i> (Thorell, 1856)	23,47	25,00
<i>Xerolycosa nemoralis</i> (Westring, 1861) ¹		1,08	
Pisauridae	<i>Pisaura mirabilis</i> (Clerck, 1757) ¹	0,20	0,09
Miturgidae	<i>Zora nemoralis</i> (Blackwal, 18611) ¹	2,37	1,98
	<i>Zora silvestris</i> (Kulczyński, 1897) ¹	0,13	0,45
	<i>Zora spinimana</i> (Sundevall, 1833)	0,92	1,80
Agelenidae	<i>Agelena labyrinthica</i> (Clerck, 1757) ¹	0,40	0,54
Cicurinidae	<i>Cicurina cicur</i> (Fabricius, 1793)	0,07	0,27
Hahniidae	<i>Hahnia ononidum</i> (Simon, 1875) ¹	0,07	0,09
Cheiracanthidae	<i>Cheiracanthium oncognathum</i> (Thorell, 1871) ¹		0,09

Окончание табл. 2

Семейство	Вид	Относительное обилие, %	
		Сосняк черничный	Сосняк мшистый
Liocranidae	<i>Agroeca brunnea</i> (Blackwall, 1833) ¹	4,02	3,96
	<i>Agroeca cuprea</i> (Menge, 1863) ¹	2,57	0,63
	<i>Agroeca proxima</i> (O. Pickard-Cambridge, 1871)	1,32	0,63
	<i>Scotina palliardi</i> (L. Koch, 1881) ¹	0,07	
Clubionidae	<i>Clubiona terrestris</i> (Westring, 1851) ¹	0,07	0,18
Gnaphosidae	<i>Drassodes pubescens</i> (Thorell, 1856) ¹	0,13	
	<i>Drassyllus praeficus</i> (L. Koch, 1866) ¹	0,07	
	<i>Gnaphosa bicolor</i> (Hahn, 1833) ¹		1,08
	<i>Haplodrassus cognatus</i> (Westring, 1861) ¹	0,07	0,09
	<i>Haplodrassus silvestris</i> (Blackwall, 1833)	0,59	0,09
	<i>Haplodrassus soerenseni</i> (Strand, 1900) ¹	1,12	6,21
	<i>Haplodrassus umbratilis</i> (L. Koch, 1866) ¹	0,40	0,36
	<i>Micaria fulgens</i> (Walckenaer, 1802) ¹		0,09
	<i>Zelotes exiguus</i> (Müller et Schenkel, 1895) ^{1*}		0,09
	<i>Zelotes clivicola</i> (L. Koch, 1870) ¹	8,17	10,61
	<i>Zelotes latreillei</i> (Simon, 1878) ¹	0,40	0,09
Philodromidae	<i>Thanatus formicinus</i> (Clerck, 1757) ¹		0,09
	<i>Thanatus sabulosus</i> (Menge, 1875) ¹	0,26	1,26
Thomisidae	<i>Tmarus piger</i> (Walckenaer, 1802) ¹	0,07	
	<i>Xysticus lanio</i> (C. L. Koch, 1835) ¹	0,07	
	<i>Xysticus luctuosus</i> (Blackwall, 1836) ¹	0,20	
Salticidae	<i>Euophrys frontalis</i> (Walckenaer, 1802) ¹		0,45
	<i>Evarcha falcata</i> (Clerck, 1757) ¹	0,53	1,35
	<i>Marpissa muscosa</i> (Clerck, 1757)		0,09
Количество видов		51	52

Примечание! – вид впервые указан для заказника «Прибужское Полесье»; * – впервые указан для Беларуси.

Всего в данных сосняках отмечен 71 вид из 17 семейств отряда пауков. Наибольшим видовым богатством характеризовалось семейство Linyphiidae, которое представлено 20 видами. В сосняке черничном зарегистрировано 12 видов, численность которых составила 4,6 % от общей численности пауков, в сосняке мшистом – 11 видов, численность которых составила 13,5 % от общей численности. Наибольшим относительным обилием характеризовалось в обоих случаях семейство Lycosidae – 60,0 % в сосняке черничном и 46,5 % в сосняке мшистом. Доминирующим видом в сосняке мшистом являлся *T. terricola* (относительное обилие 25,0 %). В сосняке черничном доминировали два вида – *A. aculeata* и *T. terricola* (30,3 и 23,5 % соответственно). На территории Шацкого национального природного парка в сосновом лесу доминировал *A. aculeata* [4].

В табл. 3 приведены характеристики видовой разнообразия пауков в сосняке черничном и мшистом заказника «Прибужское Полесье», в том числе рассчитанные значения индексов биоразнообразия для кумулятивных выборок за весь сезон.

Таблица 3. Характеристики биоразнообразия пауков сосняков черничного и мшистого

Table 3. Characteristics of biodiversity of spiders in blueberry and mossy pine forests

Показатель	Сосняк черничный	Сосняк мшистый
Количество видов	51	52
Количество особей	1517	1112
Динамическая плотность, экз/100 лов.-сут.	67,7	49,6
Индекс Шеннона	2,34	2,78
Индекс Пиелу	0,59	0,70
Индекс доминирования Симпсона	0,17	0,11
Индекс Маргалефа	6,96	7,27

В сосняке черничном численность особей пауков и их динамическая плотность превосходят количество пауков и динамическую плотность в сосняке мшистом на 26,7 %. Количество видов в исследуемых сосновых лесах различается на один вид.

Индекс видового разнообразия Шеннона, отражающий сложность структуры сообщества, основываясь на количественной представленности видов, может изменяться от 0 до 5. В исследуемых биотопах значения индекса Шеннона составляют 2,34 и 2,78, что указывает на «среднюю» сложность структуры сообществ пауков в сосняках.

Индекс Пиелу характеризует выравненность видов в сообществе. Величина индекса Пиелу изменяется от 0 до 1, при индексе, равном 1, сообщество характеризуется равным обилием всех видов. Данный показатель в черничном сосняке на 15,7 % меньше, чем во мшистом, что обусловлено выраженным доминированием одного вида – *T. terricola*.

Индекс доминирования Симпсона, указывающий на доминирование тех или иных видов, возрастает по мере доминирования одного или нескольких видов. Высокие значения параметра свидетельствуют о дисбалансе численности в пользу небольшого количества видов. Мера доминирования принимает большие значения в экосистемах с ярко выраженными доминантами (т. е. при наличии видов с большим количеством особей). Согласно данному показателю, ассамблеи пауков в сосняке черничном менее однородны по структуре доминирования, но такие различия незначительны. В целом значения индекса доминирования Симпсона невысоки, что указывает на равномерное распределение видов.

Индекс Маргалефа отражает плотность видов, или видовое богатство, на определенной территории, т. е. чем выше значение индекса, тем большим видовым богатством характеризуется данная ассамблея. Для сосняка черничного значение индекса составило 6,96, для мшистого – 7,27, что связано с несколько большим видовым богатством пауков в данном сосновом лесу.

Для исследуемых сосняков получены соответствующие индексы, рассчитанные по месяцам (рис. 1, 2).

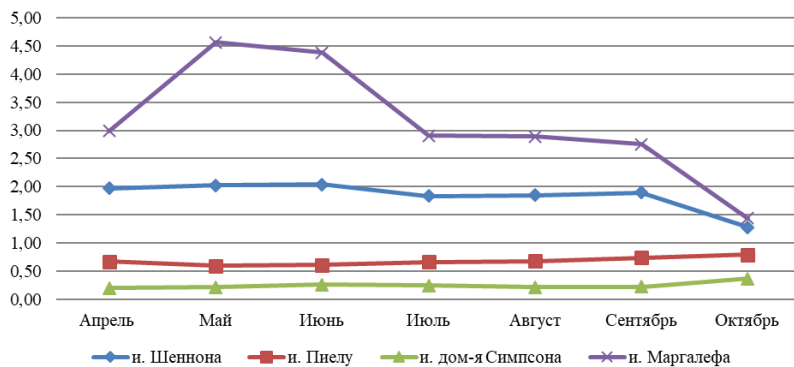


Рис. 1. Сезонная динамика индексов видового разнообразия пауков сосняка черничного

Fig. 1. Seasonal dynamics of the species diversity indices of blueberry pine forest spiders

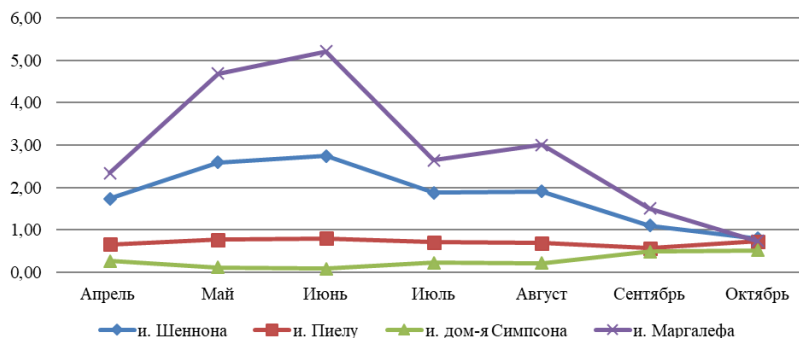


Рис. 2. Сезонная динамика индексов видового разнообразия пауков сосняка мшистого

Fig. 2. Seasonal dynamics of species diversity indices of mossy pine forest spiders

Из рис. 1, 2 видно, что видовое богатство сообществ пауков в сосняке мшистом в течение сезона характеризуется двумя пиками. Первый явный пик приходится на конец весны – начало лета, второй – на август. В сосняке черничном наблюдается один пик – в мае–июне. Такие пики обусловлены наличием большого количества самцов в весенне-летний период, затем их численность снижается.

Сложность структуры сообщества, характеризуемая индексом Шеннона, в сосняке черничном примерно одинакова в течение всего сезона. В сосняке мшистом наблюдается увеличение сложности структуры в весенне-летний период.

Индекс Пиелу в сосняке черничном растет к концу сезона, а в сосняке мшистом немного снижается в сентябре, что связано с доминированием *T. terricola*. Увеличение значения данного показателя осенью обусловлено снижением количества видов пауков в сосняке черничном и повышением выравненности их численности.

Структура доминирования пауков в сосняке черничном стабильна практически в течение всего периода наблюдений, и только к концу сезона значение показателя увеличивается, что обусловлено преобладанием *T. terricola*. В мае–июне доминирование в сосняке мшистом почти не выражено, а затем значения соответствующего показателя увеличиваются вследствие доминирования трех видов – *A. aculeata*, *P. lugubris*, *T. terricola*. В дальнейшем обилие *A. aculeata*, *P. lugubris* постепенно уменьшается и начинает доминировать *T. terricola*.

Выше приведены критерии альфа-разнообразия, но для полноты сравнения выбранных сосняков был применен индекс бета-разнообразия Брея–Кертиса, который для исследуемых сообществ составил 0,66, что указывает на достаточно близкое видовое сходство.

По результатам исследований впервые указаны 53 вида пауков для территории заказника (по данным, приведенным в работе [6]) и 1 для Беларуси – *Zelotes exiguus* (Müller et Schenkel, 1895).

Заключение. Выполненные в течение полевого сезона 2020 г. в сосняках черничном и мшистом на территории заказника «Прибужское Полесье» количественные сборы ловушками Барбера общим объемом 2629 экземпляров позволили зарегистрировать 71 вид пауков из 17 семейств, в том числе в сосняке черничном – 51 вид (1517 экз.), в сосняке мшистом – 52 вида (1112 экз.). Ранее не указывались для территории заказника 53 вида, для Беларуси – 1 вид.

Сообщество пауков сосняка черничного несколько уступает сообществу пауков сосняка мшистого по сложности структуры и выравненности. Они сходны по количеству видов и структуре доминирования. Индекс доминирования для сосняка черничного составил 0,17, для сосняка мшистого – 0,11. Индекс видового обилия для сосняка мшистого составил 7,27, что незначительно превышает значение индекса для сосняка мшистого (6,96). Доминанты в данных сосняках представлены двумя видами – *A. aculeata* и *T. terricola*. В целом результаты расчета значения индекса Брея–Кертиса указывают на сходство рассматриваемых сообществ.

Благодарности. Выражаем благодарность научному сотруднику лаборатории наземных беспозвоночных животных ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» Е. М. Жуковцу за помощь в определении паукообразных.

Acknowledgements. We express our gratitude to the researcher of the laboratory of terrestrial invertebrates of the State Scientific and Production Association “Scientific Research Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources” E. M. Zhukovets for help in identifying arachnids.

Список использованных источников

1. ГПУ «РЗ «Прибужское Полесье» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://brpp.by/>. – Дата доступа: 23.06.2021.
2. Разработка плана управления Республиканским заказником «Прибужское Полесье»: отчет о НИР (заключ.): 06 ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»; рук. С. М. Дробенков; исполн.: А. В. Кулак [и др.]. – Минск, 2011. – 109 с. – № ГР 34-5/2/1.2/2011.
3. Тыщенко, В. П. Определитель пауков европейской части СССР / В. П. Тыщенко. – Л.: Наука. Ленингр. отделение, 1971. – 281 с.
4. Євтушенко, К. В. Структура угруповань павуків (Aranei) пригрунтового ярусу чотирьох типових біотопів Шацького національного природного парку / К. В. Євтушенко // Природа Західного Полісся та прилеглих територій: зб. наук. пр. / Волин. нац. ун-т ім. Лесі Українки; редкол.: Ф. В. Зузук та ін. – Луцьк, 2013. – № 10. – С. 124–130.
5. Гірна, А. Я. Павуки вторинних екосистем Шацького національного природного парку // Екологічні проблеми навколишнього середовища та раціонального природокористування в контексті сталого розвитку: зб. матеріалів III Міжнар. наук.-практ. конф. (22–23 жовтня 2020, м. Херсон, Україна). – Херсон, 2020. – С. 168–171.

6. Жуковец, Е. М. Паукообразные (Arachnida: Aranei, Opiliones, Pseudoscorpiones) из биосферного резервата «Прибужское Полесье» / Е. М. Жуковец, О. В. Прищепчик, Н. Г. Козулько // Особо охраняемые природные территории Беларуси. Исследования : сб. науч. ст. / ред. : В. С. Ивкович [и др.]. – Минск, 2020. – Вып. 15. – С. 111–120.

7. Федосенко, Е. И. Паукообразные сосновых биогеоценозов природно-территориального комплекса «Прибужское Полесье» / Е. И. Федосенко // Эколого-биологические аспекты состояния и развития Полесского региона : сб. науч. тр. IX Междунар. науч.-практ. конф. (Мозырь, 26 нояб. 2020 г.) / УО МГПУ им. И. П. Шамякина ; редкол. : О. П. Позывайло (отв. ред.) [и др.]. – Мозырь, 2020. – С. 40–45.

8. Количественные методы в почвенной зоологии / Ю. Б. Бызова [и др.] ; отв. ред. М. С. Гиляров, Б. Р. Стриганова. – М. : Наука, 1987. – 287 с.

References

1. State reserve institute “Republican reserve Pribuzhskoe Polesie”. Available at: <https://brpp.by/> (accessed 23.06.2021) (in Russian).

2. Development of a management plan for the Pribuzhskoe Polesie Republican Wildlife Refuge: Research report (conclusion): 06 State Scientific and Production Association “Scientific Research Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources”. No. GR 34-5/2/1.2/2011. Minsk, 2011. 109 p. (in Russian).

3. Tyschenko V. P. *Keys to the spiders of the European part of the USSR*. Leningrad, Nauka. Leningradskoe otdelenie Publ., 1971. 281 p. (in Russian).

4. Jevtushenko K. V. Structure of groups of spiders (Aranei) of the soil tier of four typical biotopes of Shatsk National Nature Park. *Priroda Zahidnogo Polissya ta prileglij teritorij: zbirnik naukovih prac. Tom 10* [Nature of Western Polissya and adjacent territories: a collection of scientific works. Vol. 10]. Lutsk, 2013, pp. 124–130 (in Ukrainian).

5. Girna A. Ya. Spiders of secondary ecosystems of Shatsk National Nature Park. *Ekologichni problemy navkolyshn'ogo seredovyssha ta racional'nogo pryrodokorystuvannja v konteksti stalogo rozvytku: zbyrnyk materialiv III Mizhnarodnoi naukova-praktychnoi konferencii (22–23 zhovtnja 2020, Herson, Ukrai'na)* [Environmental problems and environmental management in the context of sustainable development: Proceedings of the III International scientific and practical conference (October 22–23, 2020, Kherson, Ukraine)]. Kherson, 2020, pp. 168–171 (in Ukrainian).

6. Zhukovets E. M., Prishchepchik O. V., Kozul'ko N. G. Arachnids (Arachnida: Aranei, Opiliones, Pseudoscorpiones) from the biosphere reserve “Pribuzhskoe Polesie”. *Osobo okhranyaemye prirodnye territorii Belarusi. Issledovaniya: sbornik nauchnykh statei. Vypusk 15* [Specially protected natural territories of Belarus. Research: collection of scientific articles. Issue 15]. Minsk, 2020, pp. 111–120 (in Russian).

7. Fedosenko E. I. Arachnid pine biogeocenoses of the natural-territorial complex “Pribuzhskoe Polesie”. *Ekologo-biologicheskie aspekty sostoyaniya i razvitiya Polesskogo regiona: sbornik nauchnykh trudov 9 Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Mozyr', 26 noyabrya 2020 goda)* [Ecological and biological aspects of the state and development of the Polesie region: collection of scientific papers of the 9th International scientific and practical conference (Mozyr, November 26, 2020)]. Mozyr, 2020, pp. 40–45 (in Russian).

8. Byzova Yu. B., Gilyarov M. S., Dunger V., Zakharov A. A., Kozlovskaya L. S., Korganova G. A. [et al.]. *Quantitative methods in soil zoology*. Moscow, Nauka Publ., 1987. 287 p. (in Russian).

Информация об авторе

Федосенко Елена Ивановна – мл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lena.kasyanik@mail.ru

Information about the author

Elena I. Fedosenko – Junior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.kasyanik@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.1+579.66
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-91-104>

Поступила в редакцию 21.04.2021
Received 21.04.2021

Е. Г. Веремеенко¹, М. А. Шапиро², О. А. Наумовская³,
Д. Д. Ашманкевич⁴, Н. П. Максимова¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³Вроцлавский университет естественных наук, Вроцлав, Польша

⁴Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении, Минск, Республика Беларусь

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA*

Аннотация. Протеомный анализ – высокоэффективный метод идентификации бактерий и определения содержания белка в прокариотических клетках при различных условиях роста бактериальной культуры. Однако данный подход практически не используется для характеристики продуцентов биологически активных веществ. Использование методов протеомного профилирования при изучении бактерий позволяет получить данные о метаболических процессах, протекающих в клетках прокариот, что дает возможность оптимизировать подходы к созданию продуцентов биологически значимых соединений.

Целью данной работы было проведение протеомного профилирования мутантных штаммов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, способных к сверхпродукции феназиновых антибиотиков, с помощью микробиологических и биохимических методов.

В ходе проведения протеомного анализа штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* впервые было продемонстрировано достаточно раннее (в *log*-фазе) начало экспрессии отдельных генов *phz*-оперона, кодирующего ферменты синтеза феназинов. Наиболее высокое содержание белка PhzO, ген которого находится за пределами *phz*-оперона, было зарегистрировано для штамма дикого типа. Не обнаружено корреляции между содержанием данного белка и концентрацией продуктов реакции, которую он катализирует. Кроме того, выявлена общая тенденция штаммов-продуцентов к накоплению ферментов и белков, входящих в комплекс системы антиоксидантной защиты. У штаммов-продуцентов также отмечено существенное увеличение содержания белков, принимающих участие в репарации ДНК, и шаперонов, способствующих восстановлению нативной конформации белков.

Ключевые слова: феназины, протеом, *phz*-оперон, антиоксидантные ферменты, пероксид водорода, репаративные процессы, сверхпродукция, ген

Для цитирования: Протеомное профилирование штаммов-продуцентов феназиновых соединений *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* / Е. Г. Веремеенко [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 91–104. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-91-104>

Katsiaryna G. Verameyenka¹, Michail A. Shapira², Volga A. Naumouskaya³,
Denis D. Ashmankevich⁴, Natalia P. Maximova¹

¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Wroclaw University of Natural Sciences, Wroclaw, Poland

⁴Center for Examinations and Tests in Health Service Republican Unitary Enterprise, Minsk, Republic of Belarus

PROTEOMIC ANALYSIS OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* STRAINS CAPABLE OF PHENASINE COMPOUNDS OVERPRODUCTION

Abstract. Proteomic analysis is a highly effective method for bacteria identification and the elucidation of protein's content in prokaryotic cells at different growth conditions. To our knowledge this approach is hardly ever used for characterization of producers of biologically active substances. The understanding of the changes in protein profile in mutant strains capable of biologically active substances overproduction helps to recognize the biochemical and molecular basis of metabolic changes which lead to overproduction. So that, proteomic analysis could be especially useful for optimization the producer's creation techniques.

The purpose of current research was to carry out proteomic profiling of bacteria *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* mutant strains capable of overproduction of phenazine antibiotics. Microbiological and biochemical methods were used for these aims.

In current research a proteomic analysis of strains of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* producing phenazines was carried out. An early (during *log*-phase) onset of expression of individual genes of *phz*-operon which codes enzymes for phenazines synthesis was demonstrated. It was also found that the wild type strain has the highest level of PhzO protein. The gene encoding this protein is located outside the *phz*-operon. We weren't able to establish the correlation among PhzO protein content and concentration of the derivatives for which appearance PhzO is responsible. A general tendency of producer strains towards the accumulation of enzymes and proteins of the antioxidant defense system was revealed. Producer strains also demonstrate a significant increase in the concentration of proteins involved in DNA repair as well as chaperones involved in the native protein conformation maintenance.

Keywords: phenazines, proteome, *phz*-operon, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, reparative processes, superproduction, gene

For citation: Verameyenko K. G., Shapira M. A., Naumouskaya V. A., Ashmankevich D. D., Maximova N. P. Proteomic analysis of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains capable of phenazine compounds overproduction. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 92–104 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-91-104>

Введение. Методы протеомного профилирования в настоящее время достаточно широко используются в медицинской микробиологии и лабораторных микробиологических исследованиях для идентификации микроорганизмов и сравнения их между собой, диагностики патологических процессов и выявления достоверных маркеров инфекционных заболеваний [1, 2], исследования патогенных штаммов микроорганизмов [2], а также для изучения процессов биоремедиации и устойчивости бактерий к антибиотикам [3, 4].

Использование методов протеомного профилирования в исследовании микроорганизмов позволяет получить более точные данные о биохимических процессах, протекающих в бактериальных клетках. Известно, что концентрация того или иного белка в клетке не определяется исключительно уровнем транскрипции соответствующего гена. Большое значение имеют процессы, происходящие на посттранскрипционном уровне, а также в ходе трансляции и посттрансляционных модификаций. Именно совокупность этих процессов и обеспечивает в итоге определенную концентрацию того или иного белка в клетках и соответствующий уровень его активности. Следует отметить, что протеомный анализ (протеомное профилирование) позволяет установить эффективность синтеза белков и их посттрансляционных модификаций именно на последних стадиях, что дает возможность определить интенсивность контролируемых бактериальными клетками метаболических реакций в целом.

Вместе с тем данный подход в настоящее время еще недостаточно широко используется для изучения особенностей метаболизма биологически активных соединений у штаммов-продуцентов. В первую очередь это связано с методологическими сложностями выделения из бактериальной клетки общей белковой фракции, необходимой для изучения протеома. На сегодняшний день еще не существует универсальных методик экстракции белков из клеток микроорганизмов в силу особенностей организации их клеточной стенки, наличия дополнительных механизмов устойчивости к воздействию факторов внешней среды, кислотам, щелочам и другим соединениям, применяемым для разрушения клеток. В связи с этим для каждого вида и даже штамма микроорганизмов необходимо разработать индивидуальный подход к экстракции белков.

Известно, что синтез феназиновых антибиотиков происходит в бактериальных клетках в стационарной фазе роста культуры [5]. В задачу данного исследования входило выявление продуктов генов *phz*-оперона (белков), задействованных в синтезе феназиновых антибиотиков, у мутантных штаммов-продуцентов данных соединений уже в *log*-фазе роста культуры, что является одним из возможных факторов, обеспечивающих сверхпродукцию феназинов у изучаемых мутантных штаммов. Одна из ключевых задач данного исследования – установить время появления Phz-белков в клетках штаммов-продуцентов для определения начала экспрессии кодирующих их генов. Данная информация крайне важна для разработки подходов к оптимизации процессов регуляции потока клеточных метаболитов в бактериальных клетках и, соответственно, переключения биосинтетических реакций на продукцию феназинов на разных стадиях роста бактериальной культуры.

Целью данной работы было проведение протеомного профилирования бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* мутантных штаммов, способных к сверхпродукции феназиновых анти-

биотиков для анализа метаболических процессов, происходящих в клетках-продуцентах уже в *log*-фазе роста культуры. В задачи исследования входил также поиск белков-кандидатов, которые связаны с приобретением мутантными штаммами способности к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков.

Материалы и методы исследования. В работе использовали штаммы *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* дикого типа (В-162), мутантные штаммы (В-162/55, В-162/255, В-162/17, В-162/2 и В-162/15), отличающиеся повышенным уровнем продукции феназиновых соединений [6], а также штамм В-162/18, полученный в результате клонирования генов положительной регуляции синтеза феназинов (*phzIR*-генов) в клетках штамма дикого типа [7].

Культивирование бактерий проводили в питательном бульоне в течение 16–18 ч при температуре 28 °С.

Каждый образец анализировали в двух биологических и двух-трех технических повторах. Белок идентифицировали как найденный, если в каждом биологическом повторе не менее чем в двух технических повторах из трех (или хотя бы в одном, если их было два) было выявлено не менее двух пептидов длиной более 7 аминокислотных остатков. В качестве меры, характеризующей количество интенсивностей обнаруженного белка, использовали среднеарифметические совокупности интенсивности сигналов найденных пептидов, принадлежащих белку. Интенсивность белка считали приемлемой, если разброс (дисперсия) интенсивностей во всех совокупных повторах составлял не более половины от абсолютного значения [8].

Для проведения протеомного анализа бактерии, выращенные в питательном бульоне до *log*-фазы роста культуры, осаждали путем центрифугирования при 15 000 об/мин в течение 1 мин, отмывали натрий-фосфатным буфером (50 мМ, рН 7,0), концентрировали в соответствующем буфере до 10^{10} – 10^{11} кл/мл. При получении бесклеточного экстракта для протеомного анализа бактериальную массу подвергали ультразвуковому воздействию с помощью дезинтегратора Bandelin UW 3100 (Reichmann, Германия) (частота 20 кГц, режим: 1,5 с экспозиция, далее 1,5 с перерыв, циклично в течение 45 с, температурный режим от –4 до 0 °С), после чего центрифугировали в течение 4 мин при 14 500 об/мин. Полученный осадок подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 10 мин при комнатной температуре и растворяли в 300 мкл деионизированной воды. К полученной взвеси добавляли 400 мкл метанола и 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали (5 мин на шейкере при 250 об/мин) и помещали на 1 ч в морозильную камеру (–20 °С). Затем смесь повторно перемешивали (см. выше) и центрифугировали в течение 15 мин при 4 °С со скоростью 13 400 об/мин. После этого верхний слой удаляли, а к оставшейся двухфазной смеси добавляли 600 мкл метанола. Образец встряхивали и центрифугировали 15 мин при 4 °С со скоростью 13 400 об/мин. Затем супернатант удаляли, а осадок подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 10 мин при комнатной температуре. При необходимости доочистки белковой фракции процедуру выделения повторяли. Полученный осадок предварительно растворяли в 150 мкл 9 М мочевины, инкубировали на шейкере при 40 °С (550 об/мин), а затем подвергали трипсинолизу. К раствору добавляли 20 мкл 50 мМ раствора дитиотриэтола и повторяли инкубирование. Затем в смесь добавляли 20 мкл 150 мМ йодацетамида и инкубировали на шейкере при 40 °С со скоростью 250 об/мин в темноте. По прошествии 10 мин в раствор добавляли 800 мкл 0,1 М раствора гидрокарбоната аммония (рН = 8,0) и 10 мкл раствора трипсина (1 мг/мл в 0,1 М растворе гидрокарбоната аммония, рН = 8,0). Полученную смесь инкубировали в течение ночи. По прошествии необходимого времени в смесь добавляли 20 мкл гексафтормасляной кислоты, центрифугировали 15 мин при 4 °С со скоростью 13 400 об/мин и подвергали твердофазной экстракции (ТФЭ).

При пробоподготовке образца для хроматографии (ТФЭ) колонки уравнивали путем последовательного нанесения 2 мл ацетонитрила, 2 мл воды и 0,5 мл 10 мМ раствора гамма-аминомасляной кислоты. Затем на колонку наносили подкисленный супернатант (рН = 5,0) после центрифугирования (15 мин при 4 °С, скорость 13 400 об/мин). После прохождения образца через колонку ее промывали 0,5 мл 0,7 %-ного раствора муравьиной кислоты и 0,5 мл дистиллированной воды. Затем колонку просушивали током воздуха в течение 10–15 мин (использовался вакуумный насос с рабочим давлением 2,5–3 атмосферы). Элюирование образцов проводили 60 %-ным

раствором ацетонитрила в 0,1 М FABS-буфере (от *англ.* Formic Acid Buffer Solution) (pH = 2,0). Полученный элюат фильтровали через 0,2 мкм политетрафторэтиленовый фильтр и закачивали (5 мкл) в хроматограф. Для разделения и анализа пептидной смеси использовали высокоэффективный хроматограф (Agilent-1290, США) с тандемным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (Agilent, США). Разделение проводили на колонке ZORBAX Extend-C18 (длина – 50 мм, внутренний диаметр – 2,1 мм, диаметр пор – 1,8 мкм) в градиенте:

0 мин – 1,5 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 98,5 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

1 мин – 1,5 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 98,5 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

35 мин – 25 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 75 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

45 мин – 40 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 60 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

50 мин – 90 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 10 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты.

Длительность анализа – 55 мин, кондиционирование колонки – 5 мин, объем вводимой пробы – 17 мкл. Для анализа данных был использован алгоритм, учитывающий все вышеописанные нюансы статистической обработки протеомных данных.

Относительное содержание белков оценивали с помощью нормирования общего количества белка в пробоподготовке после их осаждения из раствора, используя метод Лоури и метод метанол-хлороформной преципитации [9]. В качестве дополнительного инструмента нормирования использовали нормализацию к белкам «домашнего хозяйства». Количество последних было усреднено путем вычисления среднего арифметического совокупной интенсивности пептидов, относящихся к одному белку [10].

Результаты и их обсуждение. Результаты протеомного профилирования бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* дикого типа и полученных ранее мутантных штаммов, способных к сверхпродукции феназиновых антибиотиков, приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Уровни продукции феназиновых антибиотиков у штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

T a b l e 1. Phenazine antibiotics production levels at *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains

Штамм	Уровень продукции феназинов, мг/л	Ссылка
В-162	75 ± 15	Коллекция кафедры генетики БГУ
В-162/18	410 ± 26	[7]
В-162/55	210 ± 19	[6]
В-162/255	420 ± 29	[6]
В-162/17	210 ± 25	[6]
В-162/15	2100 ± 81	[6]
В-162/2	2850 ± 67	[6]

П р и м е ч а н и е. Значения уровней продукции приведены при выделении антибиотиков с помощью метода хлороформной экстракции [11]. Порядок штаммов в таблице отражает последовательность их получения и взаимосвязь между штаммами.

Особый интерес представляют белки, принимающие участие в синтезе бактериальными клетками феназиновых антибиотиков (Phz-белки). Известно, что гены, ответственные за синтез этих соединений, организованы в оперон (*phz*-оперон) [12]. Кроме того, некоторые гены, продукты которых относятся к ферментам модификации феназин-1-карбоксилата, являющегося базовым феназином (например, PhzO-белок), располагаются вне оперона [12].

Известно, что накопление феназиновых антибиотиков в культуральной жидкости бактерий рода *Pseudomonas* происходит в стационарную фазу роста (на 4–6-е сутки культивирования

в среде PCA (от *англ.* Phenazine-1-Carboxylic Acid induction medium) [13]). Однако на сегодняшний день в литературе нет сведений о том, когда именно начинается образование ферментов, участвующих в процессе их синтеза. Высказано предположение, что синтез продуктов отдельных генов *phz*-оперона, а также продуктов ряда других генов, функционально связанных с синтезом феназинов, у штаммов-продуцентов (т. е. мутантных штаммов) может начинаться уже в логарифмической фазе (*log*-фазе) роста культуры. Для проверки этого предположения нами проведен протеомный анализ бактерий дикого типа *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* и полученных на их основе мутантных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (табл. 1), находящихся в *log*-фазе роста.

В результате проведения протеомного анализа штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (табл. 1) для каждого из исследованных образцов в высоком качестве были получены и идентифицированы 144 белка. Анализ интенсивности сигнала, который коррелирует с содержанием того или иного белка в образце, показал, что исследуемые штаммы имеют существенные различия как по качественному составу белков, задействованных в синтезе феназиновых антибиотиков, так и по количественному их содержанию.

Так, у штамма В-162 содержание фермента (продукт гена *phzO*), ответственного за превращение феназин-1-карбоксилата в 2-оксифеназин и 2-оксифеназин-1-карбоксилат, достигает $44,9 \cdot 10^4$ отн. ед. (рис. 1). Ген, кодирующий соответствующий белок, располагается за пределами *phz*-оперона.

Примечательно, что по результатам ранее проведенного ВЭЖХ-анализа по изучению качественного состава феназинов, синтезируемых мутантными штаммами, было обнаружено, что у штамма В-162/55 содержание 2-окси-производных карбоксифеназина максимально и достигает 32 % от общего количества феназинов в комплексе, несмотря на относительно низкое содержание самого фермента (данные не опубликованы). У штамма В-162/255, к примеру, содержание данного фермента составляет $42,8 \cdot 10^4$ отн. ед., что, тем не менее, сопровождается падением уровня 2-окси-производных (суммарно до 24 % от общего количества феназинов в составе комплекса) и соответствует таковому для бактерий дикого типа (штамм В-162). Прямая зависимость между концентрацией 2-окси-производных и содержанием этого фермента не выявлена и у остальных изучаемых штаммов. Причиной этого, как указывалось выше, может быть его обособленное расположение вне *phz*-оперона, а также возможное участие в образовании 2-окси-производных феназин-1-карбоксилата других бактериальных ароматических монооксигеназ, к которым относится продукт гена *phzO*.

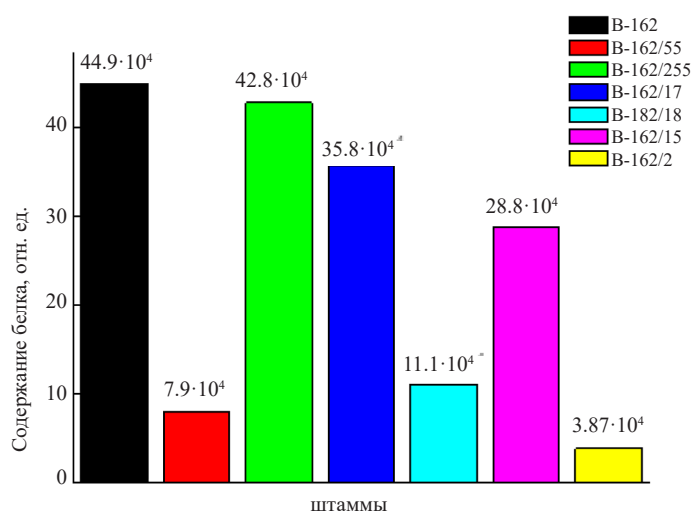


Рис. 1. Относительное содержание белка PhzO в клетках различных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Fig. 1. PhzO-protein relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers

Белки PhzA, PhzB. На логарифмической стадии роста культуры удалось детектировать и белки *phz*-оперона. Это свидетельствует о том, что экспрессия генов *phz*-оперона начинается уже в логарифмической стадии роста бактериальной культуры. В частности, были обнаружены белки PhzA и PhzB. Примечательно, что соответствующие белки присутствовали в клетках не всех штаммов. Так, PhzA-белок был обнаружен только у штаммов B-162/55 и B-162/2 (рис. 2).

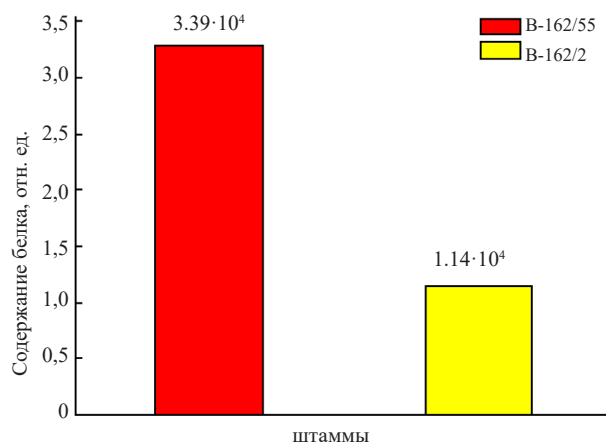


Рис. 2. Относительное содержание белка PhzA в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 2. PhzA-protein relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Белок PhzB обнаружен в протеоме как у бактерий дикого типа, так и у почти всех мутантных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (рис. 3). Следует отметить отсутствие данного белка именно у штаммов B-162/55 и B-162/2. Известно, что гены *phzA* и *phzB* представляют собой результат дупликации и демонстрируют сходство нуклеотидных последовательностей более чем на 80 % [14]. Высказываются предположения, что белки PhzA и PhzB формируют молекулярную платформу для сборки и последующего функционирования остальных ферментов пути биосинтеза феназинов [14]. Достоверно ответить на вопрос, почему изучаемые штаммы так отличаются по содержанию этих белков, пока не представляется возможным.

PhzD-белок. В клетках штамма B-162/2 обнаружен белок *phz*-оперона – PhzD. Данный белок является гомологом изохоризоматазы и осуществляет преобразование изохоризомата в транс-

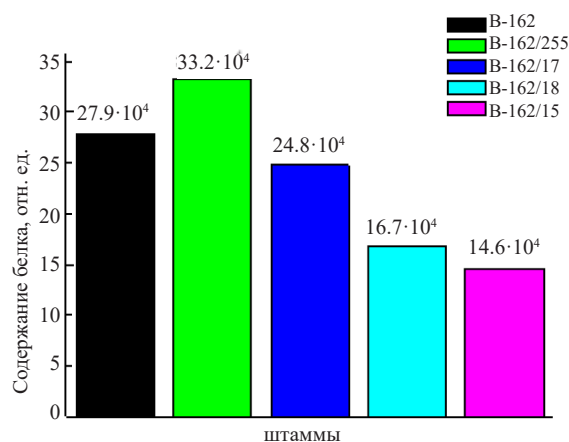


Рис. 3. Относительное содержание белка PhzB в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 3. PhzB-protein relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

2,3-дигидро-3-оксиантринилат, который, в свою очередь, служит субстратом для PhzF-белка (продукта *phzF* гена) [14]. Однако в клетках остальных штаммов PhzD-белок не обнаружен.

Ферменты антиоксидантного комплекса. Полученные данные протеомного профилирования мутантных штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* позволили выявить и ряд других интересных закономерностей, которые могут являться причиной их способности к сверхпродукции феназинов. Хорошо известно, что штаммы-продуценты феназиновых антибиотиков обладают высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов (каталазы, СОД) [15]. Это является одним из условий их выживания в условиях окислительного стресса, вызываемого сверхсинтезом собственных феназинов. При проведении протеомного анализа выявлен ряд других антиоксидантных ферментов, которые принимают участие в защите клеток-продуцентов от повышенных концентраций феназиновых антибиотиков. Так, установлено, что в клетках всех штаммов-продуцентов в высоких концентрациях присутствует один из ферментов алкилгидропероксид редуктазы (идентификационный номер A0A0E1E5S5_9PSED). Данный фермент отвечает за снижение в клетке уровня пероксида водорода и органических пероксидов [16]. Максимальное содержание этого фермента характерно для штамма дикого типа В-162 ($27,4 \cdot 10^4$ отн. ед.). У бактерий штамма В-162/255 уровень алкилгидропероксид редуктазы не превышает $9,13 \cdot 10^4$ отн. ед. У клеток штамма В-162/55 аналогичный показатель составляет $8,85 \cdot 10^4$ отн. ед., у штамма В-162/2, устойчивого к пероксиду водорода, – $0,57 \cdot 10^4$ отн. ед. Однако все штаммы-сверхпродуценты, в отличие от штаммов дикого типа, характеризуются повышенной активностью фермента каталазы [15], которая приводит к снижению концентрации пероксида водорода в клетках бактерий и во внеклеточной среде. Более низкие концентрации пероксида водорода, по-видимому, и обуславливают снижение содержания алкилгидропероксид редуктазы.

Выявлена тенденция к увеличению содержания в клетках штаммов-продуцентов тиолпероксидазы. В протеоме штамма дикого типа обнаружить данный белок не удалось, в то время как практически у всех мутантных штаммов его содержание варьировалось от $3,17 \cdot 10^4$ отн. ед. (В-162/255) до $2,21 \cdot 10^5$ отн. ед. (максимальное значение) у одного из самых продуктивных штаммов – В-162/15. Известно, что данный фермент также принимает участие в восстановлении пероксида водорода и органических пероксидов [16]. Некоторые штаммы-продуценты, в частности В-162/55, В-162/18, В-162/15 и штамм В-162/17, способный к синтезу феназинов на минимальных средах, демонстрируют значительное содержание глутаредоксина (рис. 4), однако прямой корреляции между уровнем продукции феназинов и содержанием глутаредоксина не выявлено.

В образцах, полученных из штамма дикого типа, глутаредоксин детектировать не удалось. В то же время у штамма В-162/17 данный показатель максимален и составляет $6,89 \cdot 10^4$ отн. ед.

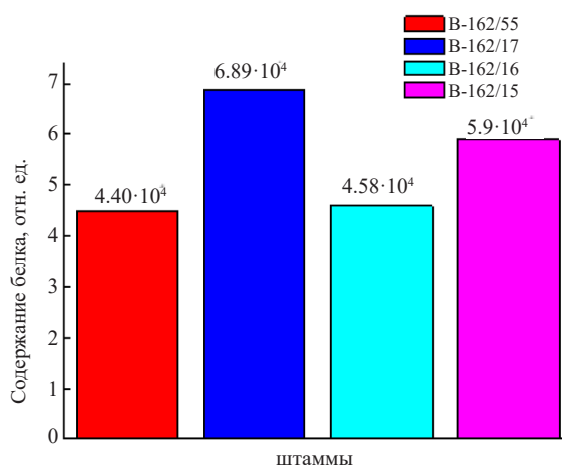


Рис. 4. Относительное содержание глутаредоксина в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 4. Glutaredoxin relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Этот белок относится к классу тиолтрансфераз и представляет собой один из элементов глутатионовой системы. Основная его функция в клетках бактерий заключается в детоксикации мышьяка и пероксидов, а также в восстановлении белков, поврежденных в результате окислительного стресса [17].

Похожие функции выполняет и пероксиредоксин [18]. В отличие от глутаредоксина, данный белок был обнаружен и в клетках В-162 (дикий тип). Однако взаимосвязи между содержанием этого белка и продуктивностью штамма не выявлено (рис. 5). Так, штамм В-162/15, который имеет один из самых высоких уровней продукции феназиновых антибиотиков (2100 мг/мл), отличается невысоким содержанием пероксиредоксина, а у штамма дикого типа с относительно невысокой продуктивностью содержание данного белка, наоборот, максимально. Еще для одного сверхпродуктивного штамма В-162/2 (см. табл. 1) присутствие пероксиредоксина не зафиксировано, равно как и для штаммов со значительно меньшим уровнем продукции феназинов (к примеру, для штаммов В-162/17 и В-162/255).

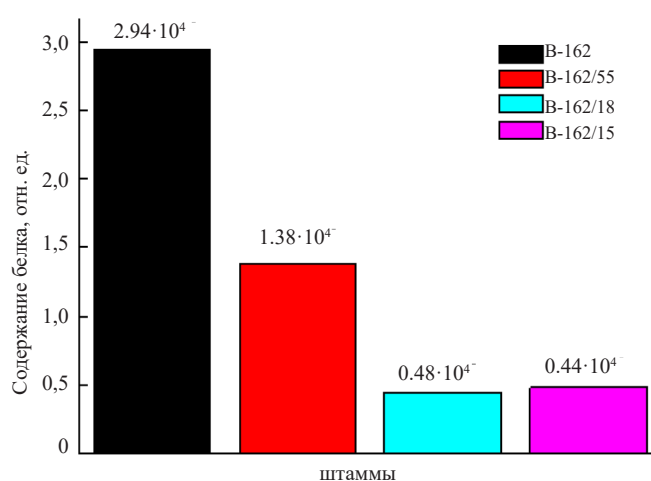


Рис. 5. Относительное содержание пероксиредоксина в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 5. Peroxiredoxin relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers. No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Серин-гидроксиметил трансфераза (СГТ), еще один обнаруженный фермент, принимает участие в защите макромолекул клетки от окислительного стресса [19]. Этот белок был выявлен только в протеоме наиболее продуктивных мутантных штаммов В-162/2 и В-162/15, селекционированных на устойчивость к пероксиду водорода, в практически равном соотношении. В реакции ретроальдольного расщепления СГТ превращает серин в глицин, одновременно перенося метильную группу на остаток фолиевой кислоты. Реакция СГТ является основным источником метильных групп для фолатного цикла. Глицин и фолиевая кислота принимают участие в синтезе пуринов и пиримидинов, а также липидов, помогая восстановить пул данных молекул после их повреждения активными формами кислорода [20].

Значительные концентрации одного из фосфат-связывающих белков (код доступа A0A089Y9J3) зарегистрированы у штаммов, способных к сверхпродукции феназинов. Этот белок обеспечивает устойчивость бактериальных клеток к окислительному стрессу в макрофагах [21]. Основным веществом, образующимся в макрофагах и используемым данным типом клеток для разрушения клеточной стенки бактерий, является пероксид водорода. Согласно данным, полученным нами ранее, это же соединение массово генерируется и при продукции феназиновых антибиотиков [15].

Представляет интерес и такой белок, как ферритин, который может принимать участие в защите клетки от последствий окислительного стресса. Известно, что при высоких концентрациях пероксида водорода железо, присутствующее в цитоплазме бактериальных клеток, может быть

окислено до наиболее токсичной его формы – Fe^{2+} . В живых системах имеются механизмы детоксикации Fe^{2+} и его удаления из цитозоля. Эти механизмы включают окисление избыточных Fe^{2+} до состояния Fe^{3+} и накопление ионов трехвалентного железа в ферритиноподобных белках. Ферритин способен связывать Fe^{3+} [22]. Примечательно, что данный белок обнаружен у всех штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков, за исключением В-162/2 и В-162/18. У штамма В-162/255 его концентрация максимальна и составляет $6,04 \cdot 10^5$ отн. ед., что почти в 3 раза выше, чем у штаммов дикого типа.

Таким образом, четко прослеживается тенденция к накоплению штаммами-продуцентами феназиновых антибиотиков пептидов и ферментов систем антиоксидантной защиты, нейтрализующих пероксид водорода. Ранее нами было показано, что у штаммов-продуцентов происходит активация ряда антиоксидантных ферментов, в частности каталазы [15]. На основании этого было сделано заключение, что в клетках продуцентов при массовом синтезе феназинов происходит накопление именно пероксида водорода, который является основной формой активного кислорода, обеспечивающей антимикробную активность феназинов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* [15]. Полученные данные протеомного анализа дополнительно подтверждают сделанные ранее выводы. Однако разные штаммы, по-видимому, используют различные комбинации пептидов и ферментов антиоксидантной защиты для обеспечения устойчивого роста культуры продуцента в условиях повышенного содержания пероксида водорода. Этим, вероятно, и объясняется отсутствие в ряде случаев прямой корреляции между уровнем синтеза феназиновых антибиотиков у отдельного штамма-продуцента и уровнем их синтеза у конкретного белка.

Шапероны. Примечательно, что единственным из обнаруженных шаперонов, содержание которого максимально в клетках штамма дикого типа, является шаперон HSP60 (GroEL) (рис. 6, а). Этот белок, являясь одним из ключевых шаперонов бактериальной клетки, обеспечивает микроокружение, в котором осуществляется фолдинг белков [23]. У штамма В-162/55 по сравнению со штаммом дикого типа в 2 раза возрастает количество шаперона DnaK (рис. 6, б). Данный белок также относится к ключевым шаперонам бактериальных клеток [23]. Механизм действия DnaK заключается в связывании и защите отдельных участков белковых цепей, которые еще не подверглись фолдингу или были уложены лишь частично. Совместно с белком ClpВ шаперон DnaK принимает участие в реактивации белков, агрегировавших после нагревания [23]. Существенное увеличение содержания базовых шаперонов в протеомах мутантных штаммов-продуцентов может являться адаптивным механизмом, направленным на защиту внутриклеточных белков и пептидов и на восстановление их нативной структуры даже в присутствии значительного количества активных форм кислорода, образующихся в клетках продуцентов под действием феназинов (рис. 6).

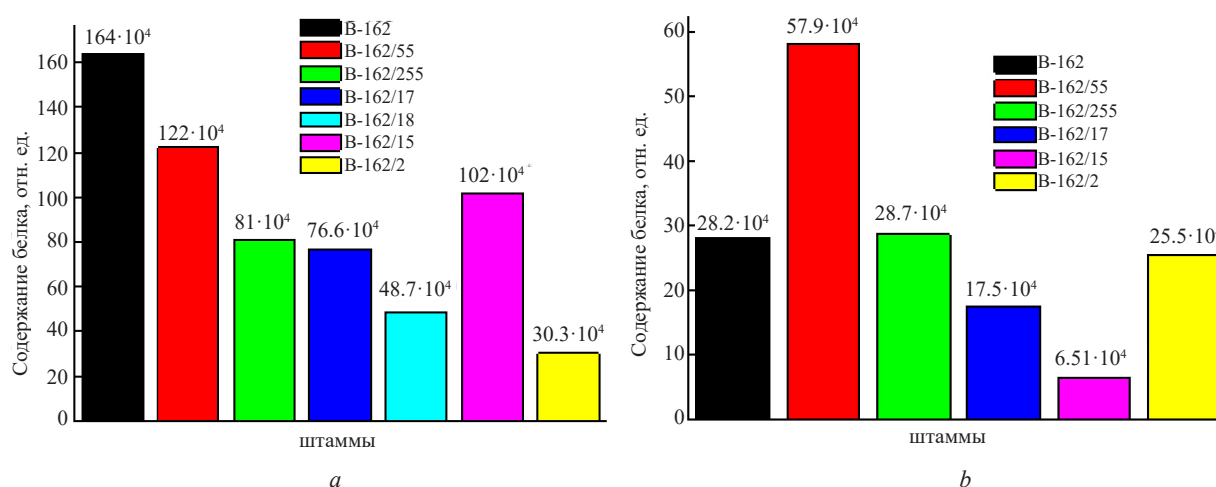


Рис. 6. Относительное содержание HSP60 (а) и DnaK (б) в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Fig. 6. The relative content of HSP60 (a) and DnaK (b) in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers

Обнаружен также шаперон Skp, принимающий участие в образовании белков внешней мембраны. Этот шаперон инкапсулирует частично свернутые белки внешней мембраны, защищая их от водной среды во время транспортировки по цистернам шероховатого эндоплазматического ретикулума и включения в липидные блоки. Он обеспечивает укладку растворимых белков в бактериальной периплазме, способствуя таким образом увеличению выхода рекомбинантных белков и факторов вирулентности бактерий [24]. Данный шаперон встречается в наибольшем количестве у штаммов B-162/15 ($8,04 \cdot 10^4$ отн. ед.) и B-162/255 ($9,09 \cdot 10^4$ отн. ед.), но отсутствует у штамма дикого типа.

Пептидилпролил-изомераза. У штаммов-продуцентов регистрируется также фермент пептидилпролил-изомеразы, тогда как в клетках штамма дикого типа этот белок не детектируется (рис. 7). Пептидилпролил-изомераза контролирует лимитирующий этап белкового фолдинга по пептидильным связям, предшествующим остаткам пролина. Обнаружено, что белки данного класса помимо непосредственной химической активности участвуют во множестве биологических процессов, таких как экспрессия генов, передача сигналов, секреция белков, развитие и регенерация тканей (у эукариот), а также могут служить факторами вирулентности у некоторых патогенных штаммов микроорганизмов [25]. Повышение концентрации этого белка наряду с описанным выше повышением концентрации шаперонов, участвующих в фолдинге белковых молекул, дополнительно подтверждает вывод о том, что одной из предпосылок сверхпродукции феназинов у штаммов-продуцентов может являться повышение эффективности систем восстановления и поддержания нативной конформации белковых молекул.

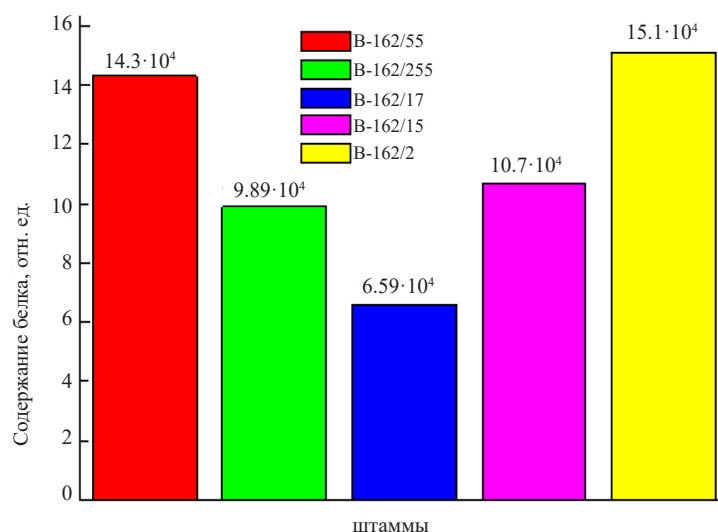


Рис. 7. Относительное содержание пептидилпролил-изомеразы в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 7. Peptide-propyl isomerase relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers. No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Ssb-белки. В ходе протеомного анализа установлено, что у некоторых штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (к примеру, B-162/255) увеличивается концентрация в их клетках Ssb-белков. Известно, что эти белки принимают участие не только в процессах репликации и рекомбинации, но и в процессах репарации, в частности в процессах репарации двунитевых разрывов ДНК [26]. Активные формы кислорода при их избыточном содержании в клетках являются одним из ключевых факторов, вызывающих повреждения молекул ДНК. Увеличение концентрации Ssb-белков служит маркером более активных репаративных процессов, что является важным условием выживания штаммов-продуцентов феназиновых соединений. На этот факт косвенно может указывать и повышение содержания фермента инозин-5-монофосфат дегидрогеназы у одного из наиболее продуктивных штаммов – B-162/255. Данный фермент ответственен за биосинтез пуриновых нуклеотидов, в первую очередь гуанина [27]. Кроме того, бактерии

штамма В-162/255 отличаются присутствием в их клетках белка бетаин-альдегид дегидрогеназы, которая полностью отсутствует у всех остальных штаммов, в том числе у штамма дикого типа В-162. Следует отметить, что наличие в геноме гена, кодирующего данный белок, характерно не только для *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, но и для других представителей рода *Pseudomonas*. Однако экспрессии гена у бактерий дикого типа и остальных мутантных штаммов либо не происходит, либо концентрация белка настолько низка, что находится на недетектируемом уровне. Бетаин-альдегид дегидрогеназа обеспечивает представителям рода адаптацию к осмотическому стрессу [28], однако ее роль в повышении продуктивности штамма не ясна.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение, что у штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков повышение концентрации ряда антиоксидантных ферментов и пептидов, связывающих активные формы кислорода, а также других протекторных белков происходит непосредственно до начала продукции феназиновых соединений. Это свидетельствует о том, что феназины сами по себе не являются индукторами активации защитных систем, а их способность к повышенной продукции обеспечивается масштабными изменениями в метаболизме продуцентов, что позволяет им противостоять высоким концентрациям собственных феназинов. Вторым важным заключением, которое следует из полученных данных, является то, что каждый штамм для защиты от высоких концентраций пероксида водорода и других активных форм кислорода, которые образуются в присутствии феназиновых соединений, по-видимому, использует индивидуальную комбинацию пептидов и ферментов системы антиоксидантной защиты. Таким образом, устойчивость каждого конкретного штамма является результатом уникального сочетания отдельных белков, тогда как общая тенденция на активизацию защитных систем сохраняет свою актуальность. В табл. 2 систематизированы данные по каждому штамму, которые позволяют составить представление о составе защитного комплекса для каждого из полученных продуцентов.

Т а б л и ц а 2. Состав защитного комплекса у штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

T a b l e 2. Protection complex composition at *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains

Штамм	Белки и их активность	Активируемые процессы
В-162	Алкилгидропероксид редуктазы, пероксиредоксин, фосфат-связывающий белок, шаперон HSP60	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода, восстановление структуры белковых молекул
В-162/55	Пептидилпролил-изомераза, шапероны DnaK и GrpE	Восстановление структуры белковых молекул
В-162/255	Ферритин, шаперон Skp, инозин-фосфат дегидрогеназа, Ssb-белки Повышенный уровень удельной активности каталазы [14]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода, восстановление структуры белковых молекул
В-162/17	Глутаредоксин	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода
В-162/2	Пептидилпролил-изомераза, серин-гидроксиметил трансфераза Повышенный уровень удельной активности СОД [29]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода, восстановление структуры белковых молекул, восстановление пула пуринов и пиримидинов после повреждения активными формами кислорода
В-162/15	Тиолпероксидаза, серин-гидроксиметил трансфераза Повышенный уровень удельной активности каталазы и СОД [29]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода
В-162/18	Повышенный уровень активности каталазы [7]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода

Заключение. Полученные данные указывают на то, что способность к сверхсинтезу феназинов закреплена генетически, что подтверждается стабильной способностью продуцентов к сверхпродукции при полном отсутствии какого-либо селективного давления при многократном пассировании штаммов в неселективных условиях. В основе этой способности лежат два ключевых

механизма: первый – это снятие механизмов регуляции синтеза феназиновых соединений на генетическом уровне в результате целого комплекса мутаций в геноме штаммов-продуцентов, второй – селективно отобранный и генетически закрепленный комплекс мутаций, которые обеспечивают устойчивость штаммов-продуцентов к высокому уровню окислительного стресса, вызываемому собственными феназинами.

Список использованных источников

1. Возможности применения протеомного анализа в инфектологии / Н. С. Страшникова [и др.] // Бюл. Сибир. медицины. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 248–261.
2. Беспятых, Ю. А. Протеомные подходы в изучении микобактерий / Ю. А. Беспятых, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 16–26.
3. A proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways / S. I. L. Kim [et al.] // OMICS: J. Integr. Biol. – 2007. – Vol. 11, N 3. – P. 280–294. <https://doi.org/10.1089/omi.2007.0019>
4. Proteomic analysis of bacterial response to a 4-hydroxybenzylidene indolinone compound, which re-sensitizes bacteria to traditional antibiotics / C. Опoku-Temeng [et al.] // J. Proteomics. – 2019. – Vol. 202. – Art. 103368. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.04.018>
5. Synthesis of dibenzo[a,j]phenazine compounds using hemicucurbit[6]uril-catalyzed oxidative dimerization of 2-aryl-amines / Heng Li [et al.] // ChemCatChem. – 2020. – Vol. 12, N 22. – P. 5727–5732. <https://doi.org/10.1002/cctc.202000956>
6. Veremeenko, E. G. Creation and characterization of regulatory mutants of *Pseudomonas aurantiaca* B-162 resistant to toxic analogues of aromatic amino acids / E. G. Veremeenko // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: materials of III Int. conf. of young scientists. – 2007. – P. 231–232.
7. Veremeenko, E. G. Increase of phenazine antibiotic production in bacteria *Pseudomonas aurantiaca* by cloning the cluster of PhzIR-genes / E. G. Veremeenko, N. P. Maksimova // Adv. Med. Biol. – 2012. – Vol. 50. – P. 195–206.
8. Statistical approach to protein quantification / S. Gerster [et al.] // Mol. Cell Proteomics. – 2014. – Vol. 13, N 2. – P. 666–677. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025445>
9. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
10. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa* / B. Alqarni [et al.] // J. Microbiol. Meth. – 2016. – Vol. 127. – P. 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.008>
11. Levitch, M. E. A study of the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid. / M. E. Levitch, E. R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1964. – Vol. 106. – P. 194–199. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
12. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation / D. V. Mavrodi [et al.] // Ann. Rev. Phytopathol. – 2006. – Vol. 44. – P. 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
13. Price-Whelan, A. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics / A. Price-Whelan, L. E. P. Dietrich, D. K. Newman // Nat. Chem. Biol. – 2006. – Vol. 2, N 2. – P. 71–78. <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
14. Of two make one: the biosynthesis of phenazines / M. Mentel [et al.] // ChemBioChem. – 2009. – Vol. 10, N 14. – P. 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>
15. Veremeenko, E. G. Activation of the antioxidant complex in *Pseudomonas aurantiaca* – producer of phenazine antibiotics / E. G. Veremeenko, N. P. Maksimova // Microbiology. – 2010. – Vol. 79, N 4. – P. 439–444. <https://doi.org/10.1134/S0026261710040041>
16. A comparison of thiol peroxidase mechanisms / L. Flohé [et al.] // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – Vol. 15, N 3. – P. 763–780. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3397>
17. Comparative analysis of glutaredoxin domains from bacterial opportunistic pathogens / T. Leeper [et al.] // Acta Crystallographica. Sec. F, Struct. boil. crystal. comm. – 2011. – Vol. 67, N 9. – P. 1141–1147. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
18. Dubbs, J. M. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense / J. M. Dubbs, S. Mongkolsuk // Peroxiredoxin Systems. – 2007. – Vol. 44. – P. 143–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_7
19. Metabolic flux ratio analysis and multi-objective optimization revealed a globally conserved and coordinated metabolic response of *E. coli* to paraquat-induced oxidative stress / T. Shen [et al.] // Mol. Biosyst. – 2013. – Vol. 9, N 1. – P. 121–132. <https://doi.org/10.1039/c2mb25285f>
20. Mullarky, E. Diverting glycolysis to combat oxidative stress / E. Mullarky, L. C. Cantley // Innovative Medicine: Basic Research and Development / eds. : K. Nakao, N. Minato, S. Uemoto. – Tokyo, 2015. – P. 3–23.
21. Characterization of two signal transduction systems involved in intracellular macrophage survival and environmental stress response in *Enterococcus faecalis* / C. Muller [et al.] // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 14. – P. 59–66. <https://doi.org/10.1159/000106083>
22. Alkhateeb, A. A. Nuclear ferritin: a new role for ferritin in cell biology / A. A. Alkhateeb, J. R. Connor // Biochim. Biophys. Acta. Gen. Sub. – 2010. – Vol. 1080, N 8. – P. 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.017>
23. Lund, P. A. Microbial molecular chaperones / P. A. Lund // Adv. Microb. Physiol. – 2001. – Vol. 44. – P. 93–140. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(01\)44012-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(01)44012-4)
24. The Skp chaperone helps fold soluble proteins *in vitro* by inhibiting aggregation / C. Chang [et al.] // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51, N 24. – P. 4822–4834. <https://doi.org/10.1021/bi300412y>

25. Ünal, C. M. Microbial peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (ppiases): virulence factors and potential alternative drug targets / C. M. Ünal, M. Steinert // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2014. – Vol. 78, N 3. – P. 544–571. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
26. Antony, E. Dynamics of *E. coli* single stranded DNA binding (SSB) protein-DNA complexes / E. Antony, T. M. Lohman // *Sem. Cell Develop. Biol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2018.03.017>
27. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase / R. Zhang [et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, N 15. – P. 4691–4700. <https://doi.org/10.1021/bi982858v>
28. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* / R. Velasco-García [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, N 4. – P. 1292–1300. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1292-1300.1999>
29. Полевой, С. А. Анализ активности ферментов антиоксидантного комплекса у бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, устойчивых к пероксиду водорода / С. А. Полевой, Е. Г. Веремеенко // 75-я науч. конф. студентов и аспирантов Белорус. гос. ун-та : материалы конф., Минск, 14–23 мая 2018 г. : в 3 ч. / Белорус. гос. ун-т ; редкол. : В. Г. Сафонов (пред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Ч. 2. – С. 330–333.

References

1. Strashnikova N. S., Martynova G. P., Salmina A. B., Olovyannikova R. Ya., Kutuyakov V. A., Tokhidpur A. Possibilities of using proteomic analysis in infectious diseases. *Byulleten' Sibirskoi meditsiny* [Bulletin of Siberian medicine], 2019, vol. 18, no. 2, pp. 248–261 (in Russian).
2. Bespyatykh Yu. A., Shitikov E. A., Pina E. N. Proteomic approaches in the study of mycobacteria. *Acta Naturae*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 16–26 (in Russian).
3. Kim S. I. L., Choi J. S., Kahng H. Y. A Proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways. *OMICS: Journal of Integrative Biology*, 2007, vol. 11, no. 3, pp. 280–294. <https://doi.org/10.1089/omi.2007.0019>
4. Opoku-Temeng C., Onyedibeb K. I., Aryalc U. K., Sintimb H. O. Proteomic analysis of bacterial response to a 4-hydroxybenzylidene indolinone compound, which re-sensitizes bacteria to traditional antibiotics. *Journal of Proteomics*, 2019, vol. 202, art. 103368. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.04.018>
5. Heng Li, Juan Yu, Qingmei Ge, Mao Liu, Zhu Tao, Hang Cong. Synthesis of dibenzo[a,j]phenazine compounds using hemicucurbit[6]uril-catalyzed oxidative dimerization of 2-arylamines. *ChemCatChem*, 2020, vol. 12, no. 22, pp. 5727–5732. <https://doi.org/10.1002/cctc.202000956>
6. Veremeenko E. G. Creation and characterization of regulatory mutants of *Pseudomonas aurantiaca* B-162 resistant to toxic analogues of aromatic amino acids. *Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: materials of III International conference of young scientists*, 2007, pp. 231–232.
7. Veremeenko E. G., Maksimova N. P. Increase of phenazine antibiotic production in bacteria *Pseudomonas aurantiaca* by cloning the cluster of PhzIR-genes. *Advances in Medicine and Biology*, 2012, vol. 50, pp. 195–206.
8. Gerster S., Kwon T., Ludwig C., Matondo M., Vogel C., Marcotte E. M., Aebersold R., Bühlmann P. Statistical approach to protein quantification. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 666–677. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025445>.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
10. Alqarni B., Colley B., Klebensberger Ja., McDougald D., Rice S. A. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, vol. 127, pp. 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.008>
11. Levitch M. E., Stadtman E. R. A study of the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid. *Archive Biochemica et Biophysica*, 1964, vol. 106, pp. 194–199. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
12. Mavrodi D. V., Blankenfeldt W., Thomashow L. S., Mentel M. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, vol. 44, pp. 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
13. Price-Whelan A., Dietrich L. E. P., Newman D. K. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Natural Chemical Biology*, 2006, vol. 2, no. 2, pp. 71–78. <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
14. Mentel M., Ahuja E. G., Mavrodi D. V., Breinbauer R., Thomashow L. S., Blankenfeldt W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem*, 2009, vol. 10, no. 14, pp. 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>
15. Veremeenko E. G., Maksimova N. P. Activation of the antioxidant complex in *Pseudomonas aurantiaca* – producer of phenazine antibiotics. *Microbiology*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 439–444. <https://doi.org/10.1134/S0026261710040041>
16. Flohé L., Toppo S., Cozza G., Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, vol. 15, no. 3, pp. 763–780. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3397>
17. Leeper T., Zhang S., Van Voorhis W. C., Myler P. J., Varani G. Comparative analysis of glutaredoxin domains from bacterial opportunistic pathogens. *Acta Crystallographica, Section F, Structural biology and crystallization communications*, 2011, vol. 67, no. 9, pp. 1141–1147. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
18. Dubbs J. M., Mongkolsuk S. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. *Peroxiredoxin Systems*, 2007, vol. 44, pp. 143–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_7
19. Shen T., Rui B., Zhou H., Zhang X., Yi Y., Wen H., Shi Y. Metabolic flux ratio analysis and multi-objective optimization revealed a globally conserved and coordinated metabolic response of *E. coli* to paraquat-induced oxidative stress. *Molecular BioSystems*, 2013, vol. 9, no. 1, pp. 121–132. <https://doi.org/10.1039/c2mb25285f>

20. Mullarky E., Cantley L. C. Diverting glycolysis to combat oxidative stress. *Innovative Medicine: Basic Research and Development*. Tokyo, 2015, pp. 3–23.
21. Muller C., Sanguinetti M., Riboulet E., Hubert L., Posteraro B., Fadda G., Auffray Y., Rinc A. Characterization of two signal transduction systems involved in intracellular macrophage survival and environmental stress response in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*, 2008, vol. 14, pp. 59–66. <https://doi.org/10.1159/000106083>
22. Alkhateeb A. A., Connor J. R. Nuclear ferritin: a new role for ferritin in cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2010, vol. 1080, no. 8, pp. 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.017>
23. Lund P. A. Microbial molecular chaperones. *Advances in Microbiological Physiology*, 2001, vol. 44, pp. 93–140. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(01\)44012-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(01)44012-4)
24. Chang C., Myhre R. O., McCallum K. C., Maynard J. A., Entzminger K. C. The Skp chaperone helps fold soluble proteins *in vitro* by inhibiting aggregation. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 24, pp. 4822–4834. <https://doi.org/10.1021/bi300412y>
25. Ünal C. M., Steinert M. Microbial peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (ppiases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiology Molecular Biology Review*, 2014, vol. 78, no. 3, pp. 544–571. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
26. Antony E., Lohman T. M. Dynamics of *E. coli* single stranded DNA binding (SSB) protein-DNA complexes. *Seminars of Cell Development Biology*, 2019, vol. 86, pp. 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2018.03.017>
27. Zhang R., Evans G., Rotella F. J., Westbrook E. M., Beno D., Huberman E., Chimiak A. J., Collart F. R. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, no. 15, pp. 4691–4700. <https://doi.org/10.1021/bi982858v>
28. Velasco-García R., Mújica-Jiménez C., Mendoza-Hernández G., Muñoz-Clares R. A. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999, vol. 181, no. 4, pp. 1292–1300. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1292-1300.1999>
29. Polevoi S. A., Veremeenko E. G. Analysis of the activity of enzymes of the antioxidant complex in the bacteria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* resistant to hydrogen peroxide. *75-ya nauchnaya konferentsiya studentov i aspirantov Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta: materialy konferentsii (Minsk, 14–23 maya 2018 g.)*. Chast' 2 [The 75th scientific conference of students and postgraduates of the Belarusian State University: conference proceedings (Minsk, May 14–23, 2018). Part 2]. Minsk, 2018, pp. 330–333 (in Russian).

Информация об авторах

Веремеенко Екатерина Геннадьевна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: veremeenkoKatya@yandex.ru

Шапиро Михаил Анатольевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shapiriomihailanatolevich@gmail.com

Наумовская Ольга Алексеевна – магистрант. Вроцлавский университет естественных наук (Agencja Rozwoju Aglomeracji Wrocławskiej SA pl. Solny 14, 50-062 Wrocław). E-mail: nnn060399@tut.by

Ашманкевич Денис Дмитриевич – специалист. Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении (Товарищеский пер., 2а, 220037, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: denis.ashmankevich@gmail.com

Максимова Наталья Павловна – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nataliamaximova@yahoo.com

Information about the authors

Katsiaryna G. Verameyenka – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veremeenkoKatya@yandex.ru

Michail A. Shapira – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shapiriomihailanatolevich@gmail.com

Volga A. Naumouskaya – Undergraduate. Wrocław University of Natural Sciences (Agencja Rozwoju Aglomeracji Wrocławskiej SA pl. Solny 14, 50-062 Wrocław). E-mail: nnn060399@tut.by

Denis D. Ashmankevich – specialist. Center for Examinations and Tests in Health Service Republican Unitary Enterprise (2a, Tovarishcheski Lane, 220037, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: denis.ashmankevich@gmail.com

Natalia P. Maximova – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nataliamaximova@yahoo.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.852.11-579.62

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-105-113>

Поступила в редакцию 19.11.2021

Received 19.11.2021

Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

КРИТЕРИИ ОТБОРА И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* – ОСНОВЫ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И КОРМОВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

Аннотация. Проведен скрининг штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, выделенных из различных природных источников. Отобраны наиболее активные бактерии-антагонисты. Изучены пробиотические свойства отобранных штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus*: спектр антимикробного действия, безопасность для макроорганизма, выживаемость при пассировании через желудочно-кишечный тракт (резистентность к кислоте и желчи), отсутствие ингибирующего действия на кишечную микрофлору, естественная резистентность неплазмидной природы к широко применяемым антимикробным препаратам. Показана перспективность использования наиболее активных культур в качестве основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, птиц и рыб.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, антагонистическая активность, пробиотики, адгезия, желчь, нормофлора, устойчивость/чувствительность к антибиотикам

Для цитирования: Сверчкова, Н. В. Критерии отбора и характеристика штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* – основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для животноводства / Н. В. Сверчкова, Э. И. Коломиец // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 105–113. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-105-113>

Natalia V. Sverchkova, Emilia I. Kolomiets

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SELECTION CRITERIA AND CHARACTERIZATION OF SPORULATING BACTERIAL STRAINS OF GENUS *BACILLUS* – THE BASIS OF PROBIOTIC PREPARATIONS AND FEED ADDITIVES FOR LIVESTOCK

Abstract. Screening of sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* isolated from various natural sources was carried out. The most active antagonistic bacteria were chosen. Probiotic properties of the selected spore-farming *Bacillus* were investigated: spectrum of antimicrobial action, safety for macroorganism, survival in transit via gastrointestinal tract (bile and acid resistance), lack of inhibiting effect on gut microbiota, native non-plasmid resistance to widely applied antimicrobial agents. The prospects of using the most active cultures as key components of probiotics and feed additives for farm stock, poultry and fish were demonstrated.

Keywords: bacteria of genus *Bacillus*, antagonistic activity, probiotics, adhesion, bile, normal flora, antibiotic resistance/sensitivity

For citation: Sverchkova N. V., Kolomiets E. I. Selection criteria and characterization of sporulating bacterial strains of genus *Bacillus* – the basis of probiotic preparations and feed additives for livestock. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 105–113 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-105-113>

Введение. Среди микроорганизмов, используемых в составе пробиотиков для ветеринарии и кормопроизводства, известны представители родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus*. Критерии включения культур в группу пробиотиков: высокие антагонистическая активность к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и скорость роста, устойчивость к кислоте и желчи, отсутствие ингибирующего влияния на нормальную микрофлору и признаков патогенности в отношении макроорганизма даже при введении в больших дозах [1–4]. Указанным критериям в полной мере соответствуют не только представители нормофлоры – молочнокис-

лые и бифидобактерии, но и бактерии рода *Bacillus*, относящиеся к группе строго аэробных или факультативно анаэробных грамположительных микроорганизмов, образующих термоустойчивые эндоспоры. Бактерии рода *Bacillus* не являются постоянным физиологическим компонентом микробиоценоза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных и человека и относятся к транзитной (самоэлиминирующейся) микрофлоре. В отличие от лакто- и бифидобактерий, механизм действия которых основан на кооперации нормофлоры с организмом хозяина, они не колонизируют слизистую оболочку ЖКТ и через 3–5 сут после прекращения приема препаратов элиминируются из организма. При различных острых и хронических заболеваниях ЖКТ терапевтическое действие в одних случаях может достигаться преимущественно за счет антагонистических свойств бацилл, в других – за счет продукции ими ферментов, в третьих – за счет активации защитных реакций. Но, как правило, высокая эффективность бацилл при лечении инфекционных заболеваний обусловлена комплексом взаимодополняющих свойств этих микроорганизмов, которые являются определяющими при выборе основы эффективного пробиотического препарата [5–8].

Цель настоящей работы – изучение пробиотических свойств отобранных из природных источников высокоактивных штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus* и перспектив их использования в качестве основы пробиотических препаратов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, птиц и рыб.

Объекты и методы исследования. Основными объектами исследования служили штаммы бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-454, *Bacillus velezensis* БИМ В-497, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-713 с высокой ферментативной и антагонистической активностью к бактериальным патогенам животных и птиц, выделенные нами из почвы и стоков животноводческих комплексов, птицефабрик, а также штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-844, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-845, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1125 – антагонисты бактериальных патогенов рыб, выделенные из речного ила и прибрежной почвы.

В качестве тест-объектов для определения антагонистической активности исследуемых культур использовали условно-патогенные бактерии родов *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pasterella*, *Salmonella* – возбудители инфекционных заболеваний ЖКТ и органов дыхательной системы животных и птиц, а также бактерии родов *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* – возбудители бактериальных болезней рыб, любезно предоставленные РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им С. Н. Вышелеского» и РУП «Институт рыбного хозяйства».

Глубинное культивирование бактерий-антагонистов осуществляли на питательной среде Мейнелла с мелассой в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при температуре 28–30 °С в течение 48 ч и в 10-литровых лабораторных ферментерах АНКУМ-10М (скорость перемешивания 200 ± 10 об/мин, температура 30 ± 2 °С, интенсивность аэрации 0,5–2,0 л воздуха/л·мин). Для засева питательной среды использовали 1–2-суточный вегетативный посевной материал в количестве 10 % об. Выращивание посевного материала спорообразующих бактерий проводили на мясо-пептонном бульоне (МПБ), выращивание тест-объектов – на МПБ в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при температуре 28–30 °С в течение 24 ч.

Анализ антимикробной активности отобранных бактерий-антагонистов осуществляли методом лунок [9]. Для определения титра (КОЕ и спор) бактерий использовали метод предельных разведений [10]. Титр спор определяли после предварительной термической обработки (10 мин при температуре 80 ± 2 °С). Процесс спорообразования бактерий-антагонистов контролировали путем микроскопирования проб культуральной жидкости (КЖ).

Определение адгезивных свойств бацилл осуществляли по методике В. И. Брилиса и Х. П. Ленцнера [11], используя в качестве модели стабилизированные глютаровым альдегидом эритроциты барана и человека.

Устойчивость бацилл к кислоте и желчи изучали в модельных опытах *in vitro* [12]. Клетки 48-часовой культуры бацилл, выращенной в среде Мейнелла, прогревали 15 мин при температуре 80 °С на водяной бане. Полученную суспензию спор осаждали путем центрифугирования (2500 об/мин, 10 мин), дважды отмывали и ресуспензировали в фосфатно-солевом буфере. Затем споровую

суспензію бацилл в количестве 0,5 мл добавляли к 4,5 мл искусственного желудочного сока (NaCl – 0,5 %, пепсин – 0,3 %, HCl до pH 2,0) и инкубировали на водяной бане при температуре 37 °С в течение 3 ч. Для проверки устойчивости бацилл к условиям кишечника споровую суспензию бацилл добавляли к искусственному кишечному соку (смешанный питательный бульон, желчь – 0,3 %, панкреатин – 0,1 %, pH 8,0) и культивировали на качалке (250 об/мин, 37 °С) 6 ч. Устойчивость клеток бацилл к желчи изучали на агаризованном мясо-пептонном бульоне с добавлением желчи в концентрациях 0,3; 0,5; 1; 5 и 10 %. Изучали также способность к росту бацилл при различных значениях pH (от 2,0 до 10,0). В работе использовали пепсин, желчь и панкреатин производства Sigma (США).

Чувствительность исследуемых бактерий рода *Bacillus* к антибиотикам (мкг/мл) определяли методом серийных разведений антибиотика в агаризованной среде [13].

При статистической обработке результатов экспериментов [14] определяли средние арифметические и их доверительные интервалы для уровня вероятности 95 % с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. На основе проведенного скрининга из более чем 2000 изолятов, выделенных из различных природных источников, отобрано 132 изолята с антимикробной активностью к бактериям *Escherichia coli* S-3, *Staphylococcus* sp. 7 – патогенам животных и птиц и 32 изолята с антагонистической активностью к возбудителям бактериальных болезней рыб *Aeromonas* sp. 56 и *Ps. putrefaciens* 62.

Максимальную антимикробную активность к испытанным бактериальным патогенам *Escherichia coli* S-3, *Staphylococcus* sp. 7 проявляли изоляты 9/9, I 22, Кл 53, у которых диаметр зоны ингибирования роста тест-объектов составлял 25,0–27,0 и 29,0–32,0 мм соответственно.

Среди 32 культур с антагонистической активностью к возбудителям бактериальных болезней рыб (*Aeromonas* sp. 56 и *Pseudomonas putrefaciens* 62) для дальнейшей работы отобрано три изолята – 2, 54, 355 (диаметр зоны подавления роста *Aeromonas* sp. и *Pseudomonas putrefaciens* составлял 26,5–32,0 и 30,0–32,5 мм соответственно).

С использованием микробиологических, молекулярно-генетических методов проведена их идентификация. Штаммы микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней сельскохозяйственных животных и птиц идентифицированы как *Bacillus amyloliquefaciens* 9/9, *Bacillus amyloliquefaciens* Кл 53, *Bacillus velezensis* I 22; штаммы микроорганизмов-антагонистов возбудителей болезней рыб идентифицированы как *Bacillus amyloliquefaciens* 2, *Bacillus amyloliquefaciens* 54 и *Bacillus amyloliquefaciens* 355.

По данным токсикологической проверки, проведенной сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», отобранные штаммы не являются патогенными и токсигенными и могут использоваться в микробиологическом производстве. Культуры депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. velezensis* БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-845, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1125.

При изучении спектра антагонистической активности отобранных штаммов (табл. 1) установлено, что все культуры обладают высокой антимикробной активностью к испытанным патогенам, причем бактерии *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *B. velezensis* БИМ В-497 проявляют более выраженное антагонистическое действие к возбудителям болезней сельскохозяйственных животных и птиц – бактериям родов *Escherichia*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus* (диаметр зоны задержки роста тест-культур находится в диапазоне 19,0–33,5 мм), а *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-845, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1125 – к патогенной и условно-патогенной микробиоте рыб (диаметр зоны задержки роста тест-объектов – 24,0–34,0 мм).

При сравнительном анализе антагонистической активности исследуемых штаммов бактерий с известными антагонистами рода *Bacillus*, в частности *B. subtilis* ВКМ В-4759Д (основа пробиотика Субалин, Россия) [15], *B. licheniformis* и *B. subtilis* (основа пробиотика Субтилис, Россия) [16], *B. licheniformis* DSM 5749 и *B. subtilis* DSM 5750 (основа пробиотика БиоПлюс2Б, Германия) [17], *B. cereus* var. *toyoi* (Тойоцерин, Германия) [18], установлено, что исследуемые культуры по

Таблица 1. Сравнительная оценка спектра антимикробного действия отобранных бактерий-антагонистов рода *Bacillus* (метод лунок) в отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных животных, птиц и рыбTable 1. Comparative evaluation of spectrum of antimicrobial action of the selected antagonistic bacteria of genus *Bacillus* (estimated by wells technique) in regard to pathogens of farm stock, poultry and fish

Тест-объект	Вызываемое заболевание	Диаметр зоны задержки роста тест-объекта, мм						
		<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-454	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-713	<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-1125	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-844	<i>B. amylolique-faciens</i> БИМ В-845	
Бактериальные патогены сельскохозяйственных животных								
<i>Escherichia coli</i> 099	Заболевания ЖКТ	25,0 ± 0,3	25,5 ± 0,2	26,5 ± 0,1	22,0 ± 0,3	21,0 ± 0,2	22,5 ± 0,1	
<i>E. coli</i> 018		21,0 ± 0,2	22,5 ± 0,1	23,5 ± 0,2	19,0 ± 0,2	20,5 ± 0,1	18,5 ± 0,3	
<i>E. coli</i> S-3		22,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	24,5 ± 0,3	18,0 ± 0,3	19,5 ± 0,2	20,5 ± 0,3	
<i>E. coli</i> A-20		21,0 ± 0,2	24,0 ± 0,3	23,5 ± 0,3	20,0 ± 0,2	20,0 ± 0,3	21,5 ± 0,3	
<i>Pasterella multacida</i> V2		22,0 ± 0,3	25,0 ± 0,2	21,0 ± 0,1	19,0 ± 0,2	21,0 ± 0,1	18,0 ± 0,2	
<i>Proteus vulgaris</i> 3		24,0 ± 0,3	23,0 ± 0,3	22,0 ± 0,3	20,0 ± 0,3	19,0 ± 0,2	18,0 ± 0,1	
<i>Salmonella dublin</i> V1		19,0 ± 0,2	18,5 ± 0,3	19,0 ± 0,3	15,0 ± 0,2	16,5 ± 0,3	16,0 ± 0,2	
<i>Salmonella holeraesuis</i> 2		21,2 ± 0,2	19,0 ± 0,2	19,0 ± 0,1	19,0 ± 0,1	18,0 ± 0,2	15,0 ± 0,1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 9		Заболевания органов дыхательной системы	21,0 ± 0,2	18,5 ± 0,2	12,0 ± 0,1	18,0 ± 0,2	16,5 ± 0,3	13,0 ± 0,2
<i>Staphylococcus</i> sp. 7			29,0 ± 0,3	32,0 ± 0,4	31,0 ± 0,3	25,0 ± 0,2	27,0 ± 0,3	28,0 ± 0,2
<i>Streptococcus</i> sp. H-2	28,5 ± 0,2		29,0 ± 0,2	30,0 ± 0,1	25,5 ± 0,2	26,0 ± 0,2	28,0 ± 0,3	
Бактериальные патогены птиц								
<i>E. coli</i> K-3	Заболевания ЖКТ	21,0 ± 0,2	26,0 ± 0,4	24,0 ± 0,2	19,0 ± 0,1	22,0 ± 0,3	20,0 ± 0,3	
<i>E. coli</i> 39A		25,0 ± 0,7	24,0 ± 0,2	20,0 ± 0,5	22,0 ± 0,4	23,0 ± 0,3	18,0 ± 0,2	
<i>Salmonella</i> sp. 3		22,0 ± 0,4	19,0 ± 0,2	20,5 ± 0,3	20,0 ± 0,2	16,0 ± 0,1	19,5 ± 0,3	
<i>Staphylococcus</i> sp. 1	Заболевания органов дыхательной системы	33,5 ± 0,3	29,5 ± 0,2	31,5 ± 0,4	29,5 ± 0,3	25,5 ± 0,2	28,5 ± 0,2	
Бактериальные патогены рыб								
<i>Aeromonas</i> sp. 40	Бактериальная геморрагическая септицемия (аэромоноз)	21,5 ± 0,2	24,0 ± 0,1	25,5 ± 0,2	26,0 ± 0,3	25,0 ± 0,3	27,0 ± 0,7	
<i>Aeromonas</i> sp. 54		22,0 ± 0,1	23,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	30,0 ± 0,2	28,0 ± 0,4	29,0 ± 0,4	
<i>Aeromonas</i> sp. 56		23,0 ± 0,3	22,5 ± 0,1	23,0 ± 0,3	30,0 ± 0,2	31,0 ± 0,4	32,0 ± 0,5	
<i>Aeromonas hydrophila</i> 63		24,5 ± 0,3	25,0 ± 0,2	23,5 ± 0,4	29,5 ± 0,3	27,5 ± 0,6	28,0 ± 0,3	
<i>A. hydrophila</i> gr.1		25,0 ± 0,2	24,5 ± 0,1	24,0 ± 0,2	31,0 ± 0,2	25,0 ± 0,3	26,5 ± 0,6	
<i>Aeromonas hydrophila</i> gr.2		25,0 ± 0,2	25,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	29,0 ± 0,3	25,5 ± 0,4	27,0 ± 0,7	
<i>Aeromonas sobria</i> 61		22,0 ± 0,3	23,0 ± 0,2	22,5 ± 0,1	25,0 ± 0,1	26,0 ± 0,3	24,0 ± 0,2	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Поражения кожи, слизистых оболочек	13,0 ± 0,1	15,0 ± 0,2	12,0 ± 0,1	20,5 ± 0,2	18,5 ± 0,2	17,0 ± 0,3	
<i>Shewanella putrefaciens</i> 62		22,0 ± 0,4	21,0 ± 0,2	22,0 ± 0,3	26,0 ± 0,1	22,5 ± 0,3	23,5 ± 0,4	
<i>Sphingobacterium multivorum</i> 60		19,0 ± 0,3	20,0 ± 0,3	20,5 ± 0,3	29,0 ± 0,3	34,0 ± 0,6	28,0 ± 0,5	

антагонистической активности не уступают зарубежным аналогам, а в отношении некоторых тест-объектов (*Pasterella multacida*, *Proteus vulgaris* и др.) превосходят их, что свидетельствует о перспективности использования отобранных культур в биологическом контроле патогенов животных.

В соответствии с требованиями, предъявляемыми к пробиотическим микроорганизмам, штаммы бактерий, не являющиеся представителями нормальной микрофлоры, должны проходить транзитом через желудок и тонкий кишечник, а представители нормофлоры должны адгезироваться на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией. В отношении спорообразующих бактерий большинство авторов отмечают их слабые адгезивные свойства [19]. Активность бацилл осуществляется в просвете кишечника и связана прежде всего не с конкурентными взаимоотношениями за места прикрепления к слизистой, а с высокой антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов [20–22]. Проведенные нами исследования подтвердили эти данные. Так, индекс адгезивности у отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus*, установленный по методике В. И. Брилиса и Х. П. Ленцера [11] с использованием

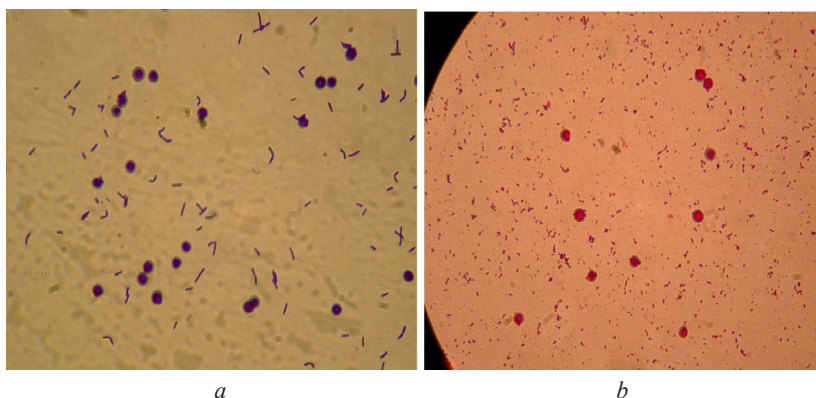
в качестве модели стабилизированных глютаровым альдегидом эритроцитов барана и человека, составляет менее 1 (табл. 2), тогда как у высокоадгезивных штаммов лактобацилл и бифидобактерий – около 4. Приведенные показатели свидетельствуют о способности спорообразующих бактерий колонизировать слизистую оболочку ЖКТ животных непродолжительное время и подтверждают принадлежность исследованных штаммов к экзогенной транзитной (самоэлиминирующейся) микрофлоре.

Таблица 2. Индекс адгезивности отобранных штаммов бактерий рода *Bacillus*

Table 2. Adhesion index of the selected bacterial strains of genus *Bacillus*

Штамм	Индекс адгезивности микроорганизмов	
	с эритроцитами барана	с эритроцитами человека
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-454	0,85	0,90
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-713	0,93	0,85
<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	0,95	0,95
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1125	0,94	0,99
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-844	0,95	0,99
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-845	0,75	0,70
<i>E. coli</i> (контроль)	1,95	1,8

Полученные результаты подтверждены и методом микроскопирования (см. рисунок). У штамма *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454 с низким уровнем адгезивности отмечены единичные случаи сорбции клеток, тогда как у контрольного штамма *E. coli* уровень адгезивной активности значительно выше.



Адгезивные свойства штаммов: а – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454; б – *E. coli* (контроль)

Adhesive properties of strains: a – *B. amyloliquefaciens* BIM В-454; b – *E. coli* (control)

Изучено влияние отобранных штаммов спорообразующих бактерий рода *Bacillus* на представителей нормофлоры ЖКТ сельскохозяйственных животных и птиц – бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Установлено, что зоны подавления роста испытанных штаммов молочнокислых и бифидобактерий (*Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*) под действием исследуемых бациллярных культур отсутствуют.

При прохождении бациллярных культур через ЖКТ их жизнеспособность может снижаться под действием желудочного сока и солей желчных кислот. По данным ряда авторов [22, 23], минимальным титром клеток и спор, способным осуществлять значимое действие в ЖКТ животного, является не менее 10^7 КОЕ. В этой связи представлялось необходимым исследовать устойчивость исследуемых штаммов к кислоте и желчи.

Выживаемость отобранных бактерий оценена при различных концентрациях желчи (от 0,3 до 10 %) и в широком диапазоне pH (от 2,0 до 10,0) в экспериментах на агаризованном мясо-пептонном бульоне. Все исследуемые бактерии оказались устойчивы к повышенным концентрациям

желчи (до 10 %) и сохраняли свою жизнеспособность при инкубировании в течение 6 ч в кислой (рН 2,0–5,0) и слабощелочной (рН 8,0–9,0) среде.

Для создания условий, которые придется преодолеть пробиотическим бактериям при прохождении через ЖКТ животного, споры отобранных культур бактерий инкубировали в течение 3 ч в искусственном желудочном соке, имеющем кислую реакцию среды (рН 2,0) и содержащем фермент пепсин. Результаты данного эксперимента показали, что титр спор исследуемых бактерий за указанный промежуток времени в модельных условиях желудка снижается незначительно, что обеспечивает достижение необходимой концентрации интродуцируемых бактерий (табл. 3).

В опыте, моделирующем условия тонкого кишечника (смешанный питательный бульон, желчь – 0,3 %, панкреатин – 0,1 %, рН 8,0), показано, что споры исследуемых бактерий проявляют устойчивость к желчи (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Оценка устойчивости штаммов бактерий рода *Bacillus* к стрессовым факторам

T a b l e 3. Resistance of bacterial strains of genus *Bacillus* to stress factors

Штамм	Титр, спор/мл		
	исходной КЖ	после инкубации в модельных условиях желудка	после инкубации в модельных условиях кишечника
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-454	2,3·10 ⁹	6,2·10 ⁸	2,5·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-713	1,3·10 ⁹	7,2·10 ⁸	2,2·10 ⁹
<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	2,1·10 ⁹	7,3·10 ⁸	3,1·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1125	1,2·10 ⁹	6,4·10 ⁸	3,3·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-844	2,3·10 ⁹	8,3·10 ⁸	2,2·10 ⁹
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-845	2,2·10 ⁹	8,2·10 ⁸	1,3·10 ⁹

Таким образом, приведенные в табл. 3 данные свидетельствуют о способности штаммов бактерий-антагонистов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *B. velezensis* БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1125, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-845 выживать в различных отделах ЖКТ, проявляя высокую устойчивость к желчи, кислоте, щелочным условиям среды, что может быть связано с образованием бактериями эндоспор, которые обуславливают невосприимчивость к действию стрессовых факторов.

Современные схемы лечения животных и птиц предусматривают антибиотикотерапию с одновременным применением пробиотиков для профилактики и коррекции дисбиотических состояний ЖКТ. Поэтому желательным, чтобы пробиотические штаммы рода *Bacillus* были устойчивы к терапевтическим дозам антибиотиков, применяемых в ветеринарной практике. С другой стороны, высокая устойчивость к антибиотикам может быть обусловлена присутствием в клетках пробиотических бактерий генетических детерминант, которые могут передаваться другим микроорганизмам, в том числе патогенным и условно-патогенным. Поэтому Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA) ввело ограничения на использование в биотехнологии штаммов бактерий, устойчивость которых к «показательным» антибиотикам превышает установленные значения [22, 23].

Для изучения устойчивости/чувствительности отобранных бацилл к антибиотикам были использованы антибиотики 8 групп – пенициллинов (ампициллин), аминогликозидов (стрептомицин, гентамицин, канамицин), левомицитинов (хлорамфеникол), цефалоспоринов (цефазолин), тетрациклинов (доксциклин), макролидов (эритромицин) (табл. 4).

Показано, что исследуемые культуры проявляют устойчивость к ампициллину (300 мкг/мл), стрептомицину (20 мкг/мл), хлорамфениколу (10 мкг/мл) и чувствительны к гентамицину, канамицину, цефазолину, доксициклину, эритромицину в испытанных концентрациях. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения бактериальных препаратов во время лечения ампициллином, стрептомицином, хлорамфениколом.

Присутствие в клетках пробиотических бактерий внехромосомных генетических элементов рассматривается как нежелательное свойство, поскольку существует риск передачи резистентности

Т а б л и ц а 4. Устойчивость штаммов бактерий *B. subtilis* к антибиотическим препаратамT a b l e 4. Resistance of *B. subtilis* strains to antibiotics

Штамм	Антибиотики							
	Amp ³⁰⁰	Str ²⁰	Chl ¹⁰	Gm ⁵	Km ⁵	Cef ⁵	Dc ⁵	Ery ⁵
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-454	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-713	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. velezensis</i> БИМ В-497	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1125	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-844	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-845	+	+	+	–	–	–	–	–

П р и м е ч а н и е. Используемые антибиотики (мкг/мл): Amp³⁰⁰ – ампицилин 300, Str²⁰ – стрептомицин 20, Chl¹⁰ – хлорамфеникол 10, Gm⁵ – гентамицин 5, Km⁵ – канамицин 5, Cef⁵ – цефазолин 5, Dc⁵ – доксициклин 5, Ery⁵ – эритромицин 5; «+» – устойчивые культуры, «–» – чувствительные культуры.

от пробиотических штаммов к патогенам и комменсальной микробиоте. Поэтому для производства препаратов-пробиотиков рекомендуется использовать бесплазмидные штаммы микроорганизмов. Молекулярно-генетические исследования показали, что отобранные штаммы не содержат резидентных плазмид, что подтверждает хромосомную локализацию детерминант антибиотикоустойчивости. Таким образом, при использовании выделенных штаммов в ветеринарии и кормопроизводстве не возникает опасности появления резистентности у патогенов, что обуславливает перспективность применения бактерий-антагонистов в качестве основы пробиотических препаратов.

З а к л ю ч е н и е. Исследованы биологические свойства штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. velezensis* БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-844, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-845, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1125 – антагонистов патогенов сельскохозяйственных животных, птиц и рыб. Установлено, что культуры *B. amyloliquefaciens* БИМ В-454, *B. velezensis* I 22 БИМ В-497, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-713 обладают широким спектром антагонистической активности к возбудителям болезней сельскохозяйственных животных и птиц; штаммы *B. amyloliquefaciens* БИМ В-844, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-355, *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1125 проявляют высокую антагонистическую активность к возбудителям болезней прудовых и ценных видов рыб. Штаммы-антагонисты не ингибируют роста представителей нормальной кишечной микробиоты; принадлежат к экзогенной транзитной (самоэлиминирующейся) микрофлоре, о чем свидетельствует индекс адгезивности менее 1; устойчивы к кислотному стрессу (рН от 2 до 10), желчи (от 0,3 до 10 %); проявляют устойчивость к ампициллину (300 мкг/мл), стрептомицину (20 мкг/мл), хлорамфениколу (10 мкг/мл); не содержат плазмид; не являются патогенными, токсигенными, аллергенными и могут использоваться в микробиологическом производстве. По совокупности исследованных признаков отобранные штаммы бактерий сравнимы или превосходят лучшие зарубежные аналоги и могут служить основой новых высокоактивных пробиотических препаратов для ветеринарии и кормопроизводства.

Список использованных источников

1. Markowiak, P. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition / P. Markowiak, K. Śliżewska // Gut Pathogens. – 2018. – Vol. 10. – Art. 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
2. Перспективы применения пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* / М. К. Койлыбаева [и др.] // Вестн. Казах. нац. мед. ун-та. – 2018. – № 4. – С. 181–184.
3. Cutting, S. M. *Bacillus* probiotics / S. M. Cutting // Food Microbiol. – 2011. – Vol. 28, N 2. – P. 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
4. Похиленко, В. Пробиотики: профессиональный взгляд и тема выбора / В. Похиленко // Ценовик. – 2016. – № 12. – С. 50–52.
5. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics / H. A. Hong [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105, N 2. – P. 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>

6. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease / B. Sánchez [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2017. – Vol. 61, N 1. – Art. 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
7. Patel, R. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics / R. Patel, H. L. DuPont // *Clin. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 60, suppl. 2. – P. 108–121. <https://doi.org/10.1093/cid/civ177>
8. Гатауллин, А. Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / А. Г. Гатауллин. – М., 2005. – 131 л.
9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / М. Н. Пименова [и др.] ; под ред. Н. С. Егорова. – 3-е изд. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
10. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / И. В. Асеева [и др.] ; под ред. Д. Г. Звягинцева. – 2-е изд. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 302 с.
11. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис [и др.] // *Лаб. дело.* – 1986. – № 4. – С. 210–212.
12. Коррекция нарушений микробиоценоза человека с помощью пробиотиков / М. Ю. Волков [и др.] // *Вопр. питания.* – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 32–35.
13. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии : учеб. пособие / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева ; под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2004. – 256 с.
14. Тюрин, Ю. Н. Статистический анализ данных на компьютере / Ю. Н. Тюрин, А. А. Макаров. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : ИНФРА-М, 2002. – 528 с.
15. Сорокулова, И. Б. Пробиотик Субалин – принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций [Электронный ресурс] / И. Б. Сорокулова. – Режим доступа: <http://subalin.com.ua>. – Дата доступа: 08.10.2021.
16. Шульга, Е. А. Лечебные свойства пробиотика Субтилис при репарации кожных покровов осетровых рыб / Е. А. Шульга, Ю. Н. Грозеску, А. А. Бахарева // *Вестн. Астрахан. гос. техн. ун-та. Сер. Рыб. хоз-во.* – 2009. – № 1. – С. 86–89.
17. Башкиров, О. Г. Биоплюс 2Б – современный, высокоэффективный пробиотик / О. Г. Башкиров // *Зооиндустрия.* – 2011. – № 11. – С. 5–8.
18. Желамский, С. В. Новый пробиотик Тойоцерин [Электронный ресурс] / С. В. Желамский // *Ценовик.* – 2005. – № 2. – Режим доступа: www.tsenovik.ru. – Дата доступа: 12.10.2020.
19. Плотникова, Е. Ю. Эффекты активных метаболитов *Bacillus subtilis* в пробиотическом продукте нового поколения / Е. Ю. Плотникова // *Мед. образование.* – 2018. – Т. 2, № 3. – С. 39–44.
20. Смирнов, В. В. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов / В. В. Смирнов, Н. К. Коваленко // *Микробиол. журн.* – 2002. – № 4. – С. 62–80.
21. Пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus* в птицеводстве / Н. В. Феоктисова [и др.] // *Уч. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2017. – Т. 159, № 1. – С. 85–107.
22. Савустьяненко, А. В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* / А. В. Савустьяненко // *Актуальная инфектология.* – 2016. – № 2. – С. 35–44.
23. Marshall, V. M. Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects (2005) / V. M. Marshal // *Int. J. Dairy Technol.* – 2007. – Vol. 60, N 1. – P. 63–64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00272.x>

References

1. Markowiak P., Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 2018, vol. 10, art. 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
2. Koilybaeva M. K., Ustenova G. O., Batyrbaeva D. Zh., Alibaeva Zh. S., Mustafina K. K. Application prospects of probiotics based on bacteria *Bacillus*. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of the Kazakh National Medical University], 2018, no. 4, pp. 181–184 (in Russian).
3. Cutting S. M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 2011, vol. 28, no. 2, pp. 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
4. Pokhilenko V. Probiotics: professional outlook and choice dilemma. *Tsenovik* [Price analyst], 2016, no. 12, pp. 50–52 (in Russian).
5. Hong H. A., Huang J.-M., Khaneja R., Hiep L. V., Urdaci M. C., Cutting S. M. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, vol. 105, pp. 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03773.x>
6. Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2017, vol. 61, no. 1, art. 1600240. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600240>
7. Patel R., DuPont H. L. New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 2015, vol. 60, suppl. 2, pp. 108–121. <https://doi.org/10.1093/cid/civ177>
8. Gataullin A. G. *Biological properties of Bacillus subtilis strains promising for generation of novel probiotics*. Ph. D. diss. Moscow, 2005. 131 p. (in Russian).
9. Pimenova M. N., Grechushkina N. N., Netrusov A. I., Semenova E. V., Zakharchuk L. M., Zinchenko V. V., Kolotilova N. N., Myl'nikova S. I., Nefelova M. V., Botvinko I. V. *Directory of practical studies on microbiology. 3rd ed.* Moscow, Publishing house of Moscow University, 1995. 224 p. (in Russian).
10. Aseeva I. V., Bab'eva I. P., Byzov B. A., Guzev V. S., Dobrovol'skaya T. G., Zvyagintsev D. G. [et al.]. *Methods of soil microbiology and biochemistry. 2nd ed.* Moscow, Publishing house of Moscow University, 1991. 302 p. (in Russian).

11. Brilis V. I., Brilene T. A., Lentsner Kh. P., Lentsner A. A. Methodology of studying adhesive process in microorganisms. *Laboratornoe delo* [Laboratory practice], 1986, no. 4, pp. 210–212 (in Russian).
12. Volkov M. Yu., Sinitsa A. V., Tkachenko E. I., Uspenskii Yu. P., Tikhonov I. V. Correction of human microbiocenosis disturbances with the help of probiotics. *Voprosy pitaniya* [Aspects of nutrition], 2006, vol. 75, no. 4, pp. 32–35 (in Russian).
13. Tepper E. Z., Shil'nikova V. K., Pereverzeva G. I. *Practical studies in microbiology: a manual*. Moscow, Drofa Publ., 2004. 256 p. (in Russian).
14. Tyurin Yu., Makarov A. A. *Computer-aided statistical data analysis*. Moscow, INFRA-M Publ., 2002. 528 p. (in Russian).
15. Sorokulova I. B. *Probiotic Subalin – a radical novel approach to treatment of bacterial and viral infections*. Available at: <http://subalin.com.ua/> (accessed 08.09.2021).
16. Shul'ga E. A., Grozesku Yu. N., Bakhareva A. A. The medicinal properties of probiotic “Subtilis” at the reparation of sturgeon coverlet. *Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. Seriya Rybnoe khozyaistvo* [Bulletin of the Astrakhan State Technical University. Fisheries Series], 2009, no. 1, pp. 86–89 (in Russian).
17. Bashkurov O. G. BioPlus 2B – up-to-date supereffective probiotic. *Zooindustriya* [Animal husbandry], 2011, no. 11, pp. 5–8 (in Russian).
18. Zhelamskii S. V. Novel probiotic Toyocerin. *Tsenovik* [Price analyst], 2005, no. 2. Available at: <http://www.tsenovik.ru> (accessed 12.10.2021).
19. Plotnikova E. Yu. Effects of *Bacillus subtilis* active metabolites in probiotic product of novel generation. *Russkii meditsinskii zhurnal. Meditsinskoe obozrenie* [Russian medical journal. Medical review], 2018, vol. 2, no. 3, pp. 39–44 (in Russian).
20. Smirnov V. V., Kovalenko N. K. Probiotics based on living microbial cultures. *Mikrobiologicheskii zhurnal* [Microbiological journal], 2002, no. 4, pp. 62–80 (in Russian).
21. Feoktistova N. V., Mardanova A. M., Khadieva G. F., Sharipova M. R. Probiotics based on bacteria of genus *Bacillus* in poultry breeding. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki* [Scientific notes of Kazan University. Series Natural Sciences], 2017, vol. 159, no. 1, pp. 85–107 (in Russian).
22. Savust'yanenko A. V. Mechanisms of probiotics action shown by *Bacillus subtilis*. *Aktual'naya infektologiya* [Modern infectology], 2016, no. 2, pp. 35–44 (in Russian).
23. Marshall V. M. Probiotics and prebiotics: scientific aspects (2005). *International Journal of Dairy Technology*, 2007, vol. 60, no. 1, pp. 63–64. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00272.x>

Информация об авторах

Сверчкова Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sverchkova@mbio.bas-net.by

Коломиец Эмилия Ивановна – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Natalia V. Sverchkova – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sverchkova@mbio.bas-net.by

Emiliya I. Kolomiets – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@mbio.bas-net.by

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.241
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-114-126>

Поступила в редакцию 22.07.2021
Received 22.07.2021

И. Д. Волотовский, С. В. Пинчук

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ТРЕХМЕРНАЯ 3D-БИОПЕЧАТЬ: ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ
И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИНТЕРЕСАХ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ**

Аннотация. Настоящий обзор посвящен одной из актуальных проблем современной биологии и медицины, свидетелями бурного развития которых мы являемся. Представлена информация о сущности метода 3D-печати, оборудовании, используемом для изготовления трехмерных биопродуктов, и природе расходных материалов – биочернил, наполнителей и клеток, которые в ходе биопечати превращаются в трехмерный продукт, характеризующийся жизнеспособностью и экспрессией специфических маркерных факторов соответствующих тканей и органов. Особый акцент сделан на перспективах использования при биопечати стволовых клеток наряду с самыми разнообразными клетками тканей и органов. Дано описание методов 3D-печати – струйного, экструзионного и лазерного и рассмотрены преимущества и недостатки каждого из них. Подробно описываются биочернила, их состав, использование в различных технологиях биопечати и стратегия подбора носителей и клеточного состава биочернил, определяющих жизнеспособность трехмерных структур и возможность их применения в клинической практике. Приводится краткий перечень достижений в области биопечати различных тканей организма и дается характеристика получаемых биопродуктов. Отмечаются значительный прогресс и перспективность исследований в данной области.

Ключевые слова: стволовые клетки, биопечать, биочернила, регенеративная медицина, тканевая инженерия, «ниша» стволовых клеток, трехмерные продукты биопечати

Для цитирования: Волотовский, И. Д. Трехмерная 3D-биопечать: основы технологии и ее использование в интересах биологии и медицины / И. Д. Волотовский, С. В. Пинчук // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 114–126. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-114-126>

Igor D. Volotovski, Sergei V. Pinchuk

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**THREE-DIMENSIONAL 3D-BIOPRINTING: THE BASIS OF TECHNOLOGY
AND ITS APPLICATION IN THE INTERESTS OF BIOLOGY AND MEDICINE**

Abstract. This review is devoted to one of the actual problem of modern biology and medicine, we are witnessing. The text provides information on 3D printing method, equipment that is used to manufacture of three-dimensional bioproducts and the nature of the consumable materials – bioinks, fillers and cells which during printing transform into three-dimensional bioproduct characterized by vitality and expression of specific marker factors of corresponding tissues and organs. Special emphasis in this review is made on prospects of use of stem cells which are along with a variety of cells of tissues and organs have found application in bioprinting. Three methods of bioprinting: inkjet, extrusion and laser are described. Advantages and disadvantages of each method are discussed. Bioinks, their properties applicability to various printing technologies and strategy selection of bioink and cell composition defining viability of three-dimensional structures and possibility of their application in clinical praxis are detailly described. Short list of achievements in the field of bioprinting of various organism tissues and the characteristics of the bioproducts obtained are given. Significant progress and promising research in the field of 3D bioprinting are marked.

Keywords: pluripotent stem cells, bioprinting, biomaterials, bioinks, regenerative medicine, tissue engineering, stem cell “niche”, three-dimensional products of bioprinting

For citation: Volotovski I. D., Pinchuk S. V. Three-dimensional 3D-bioprinting: the basis of technology and its application in the interests of biology and medicine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 114–126 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-114-126>

Тканевая інженерыя прадполагае стварэнне аднаго комплексу біоматэрыялаў – розных носьбітаў (матрыц, каркасоў або скаффолдаў), клетак і рэгуляторных біомалекул – з мэтай востановлення, захавання або ўлучшэння структуры павражэнных тканей і даўе органаў [1, 2].

Стратэгічнаска працэс тканевай інженерыі пачынаецца з падбору складанага носьбіта, пасля чаго следуе ўвядзенне ў яго клетак. Варыянтаў для біопечаті ўсёга два: ізначальнае ўнесенне ў склад носьбітаў клетак розных тыпаў у якасць асновы будучай ткані і ўнесенне ствалоўых клетак з іх даўнейшай праліферацыяй і дыфференцыроўкай у нужныя клеточныя тыпы. Клеткі, выбраныя для біопечаті, павжны максімальна востроізвадзіць естэсвеннае фізіялагічнаскае састаянне клетак *in vivo* і састаянне ў сваіх уласцівасцях у аптымальных умовах. Для аптымізацыі тканевай інженерыі іспользуемыя носьбіты павжны быць дастаточна прастымі, а ўносимыя ў іх клеткі павжны састаянне сваю структуру і функцыянальную жыццеспасобнасць у тэчэнне дастаточна прадолжытэльнага врэмені. Інымі словамі, у біокомплексе павжны быць састаянныя спецыфічныя «нішы», характэрызуемыя мікраархітэктурой, катрая абеспечывае падтрыманне структурна-механічных уласцівасцяў комплексу, дастаточнае паступленне павітацельных вэсцтваў к клеткам, іх інтэграцыю з мішэню з мэтай яе рэканструіравання і састаянныя характэрыстыкі набухання і краткасрочнай састаяннасці.

Састаяннае 3D-печатэ абеспечывае эфэктыўную састаянку вышэпералічаных кампанэнтаў у фінальнэй біоклеточнэй прадукце пры ўмовах правільнага падбору біоматэрыялаў, тэхнікі печаті і мэтадаў даставкі клетак. 3D-прінтэры састаянныя складныя мадэльныя структуры з апрыдэлянным прастранствэнным располжэннем кампанэнтаў, састаянненнем клеточных функцыяў і іх жыццеспасобнасці. Так как напечатаныя з павмощю 3D-тэхналагій ткані развіваюцца *in vivo*, іх тканевыя структуры (павры, каналы і сеті) не павжны быць падвэржэны каллапсу і павжны абладатэ састаяннасцю к рэмадэліраванню, аблегчаючы фарміраванне структур, нахадзяцца пад клеточным і арганізмэнным кантралем.

Працэс печаті базіруецца на двух вавжных састаянныя: біочэрніле – матэрыяле, выпалняючым ролé экстарэцэлулярнага матрыкса, падтрымываючэго клеточную адгезію, праліферацыю і дыфференцыроўку, і біобумаге. Обычна клеткі павры печатэ дыспергуіруюцца ў біочэрнілах, ізгавотвлэнных із гідрагеля.

Біобумага – гэто субстрат, благавдаря структурнаму аснову катэраго ў рэзултыта біопечаті з іспользаваннем біочэрніла дэпавніруюцца клеткі, явліяючыся аснову спецыфічнаскай мадэльнай біоструктуры [3, 4].

Для састаянку «ткані на блюде» прымяняюць і так называемую 2D-струйнаю печатэ, з павмощю катэраю могуць быць састаянныя *in vitro* такія біоструктуры, как кавжа і нервная ткань. Пры гэтым ў рамках мэтадаў састаянныя многаслоўных структур, как, напрыклад, 3D-блоттынга, іспользуюцца как састаянныя біадэградіруемыя, так і естэсвенныя прыродныя павлімеры. Пры састаянныя біочэрніла ў якасць другога ключэваго кампанэнта прымяняюцца самыя разлчыныя клеткі [5, 6].

Характэрыстыка расходных матэрыялаў, прымяняемых пры 3D-біопечаті. Пэравначальна тэхналагія 3D-печаті былі разрабатаны для тэхнічнаскага прымянення, не састаяннага з біалагіяй (асаждэне мэтэлаў, ізгавотвлэнне кэрамікі і тэрмапластычных павлімерных матэрыялаў з іспользаваннем арганічных расстварітэляў, вавсокіх тэмператур і разлчыных дававак, катэрыя несавместімы з жывымі клеткамі і біалагічэскімі структурамі). Такім абразом, аднаю із асновных завад ў абласці 3D-біопечаті был поіск матэрыялаў, катэрыя не тавлькі састаянныя з біалагічэскімі структурамі і працэсам печаті, но і абеспечываюць тэбуемыя механічныя і функцыянальныя уласцівасці тканевых састаян. Такія матэрыялы былі падобраны, і яны павлучылі названне біочэрніла.

Біочэрніла. У склад біочэрніла вавходат гідрагелевэй расствар і клеткі. Малекулы гідрагелэй не тавлькі кантактуіруюць з клеткамі, но і апрыдэляюць іх многія уласцівасці. Іспользуюцца гідрагелі двух тыпаў – натуральныя і састаянныя. К пэравым адносяцца павлімеры, явліяючыся естэсвеннымі кампанэнтамі экстарэцэлулярнага матрыкса (желатін, коллаген, ламінін, фібронектін), а такжэ такія прыродныя павлімеры, как альгінат, хітозан і фіброін шёлка. Састаянныя састаянныя павлімерав, іспользуемых ў біочэрнілах, авчэно многу, а іх уласцівасці не тавлькі хаваша кантраліруемы, но іх мавжно і праграміраватэ пры састаянныя гэтых састаянныя [5, 7].

В составе идеальной 3D-конструкции клетки способны пролиферировать и мигрировать, как это имеет место в функционирующей ткани. Микроокружение в «нише», формирующееся в составе биочернил, выступает в роли ключевого фактора, определяющего «судьбу» клетки, как это следует из основных представлений биологии развития. Экстрацеллюлярный клеточный матрикс обеспечивает механические и химические условия самосборки биокомплекса *in vitro*. Чаще всего, как уже указывалось, в качестве биочернил используют гидрогели, благодаря которым клетки могут адгезировать и расти.

В работах В. И. Куликовской с сотр. [8–10], проведенных совместно с Институтом биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, изучены различные полимерные многослойные пленки на основе отрицательно заряженных (пектин, сульфат декстрана, карбоксиметилцеллюлоза) и положительно заряженных (полисахарид хитозан и синтетический полиэлектролит (полиэтиленмин)) полимеров, а также получены тонкие пленки из поли-L-молочной кислоты, которые эффективно адсорбировали стволовые клетки.

Еще одним подходом является использование альгинатов с добавками других гелевых соединений, например желатина [11, 12]. В этой смеси мезенхимальные стволовые клетки (МСК) сохраняли высокую жизнеспособность (до 85 %) в течение 3 дней после внесения в культуру. Другие биочернила с уникальными свойствами термогеллинга, включая карбоксилированную агарозу, позволяют изготавливать скаффолды с заданными механическими свойствами, т. е. воспроизводить естественные механические свойства функционирующей ткани. Пептидные биочернила, содержащие в своем составе лизиновые гексапептиды, самособираются в стабильные нанопфиброзные трехмерные гидрогели, обладающие высокой жесткостью, которые, кстати, биосовместимы с МСК.

Говоря о биосовместимости биочернил и клеток, следует отметить следующее. Биосовместимость для процесса биопечати означает активный и контролируемый вклад компонентов в функциональное состояние всей конструкции. Это может проявляться во взаимодействии с тканями организма или иммунной системой, в поддержании необходимой клеточной активности и позитивном воздействии биочернил на молекулярные или механические сигнальные системы. Эти моменты крайне важны для последующего использования полученных продуктов в составе организма или отдельных органов.

Большинство биочернил по своим свойствам гидрофильны. Однако разработаны и гидрофобные биочернила. Так, нашли применение жидкие гидрофобные биочернила на основе перфтортрибутиламина, формирующиеся в 3D-конструкцию типа экстрацеллюлярного клеточного матрикса, в котором клетки хорошо пролиферируют [13].

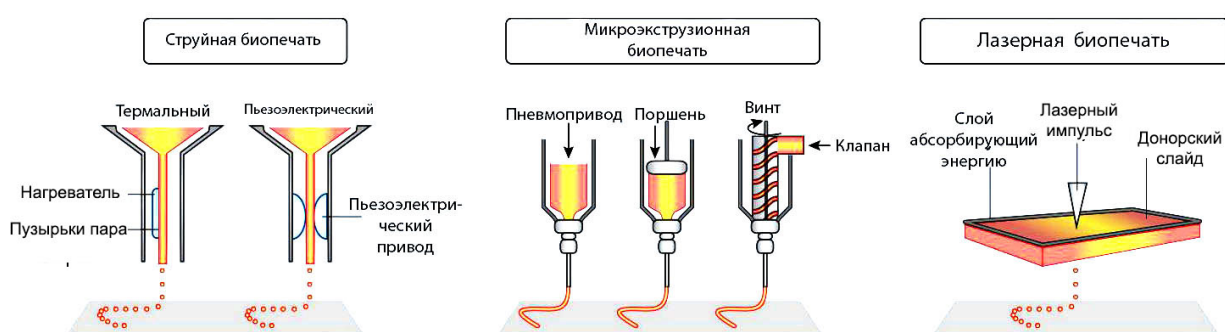
Подводя итог изложенному выше, следует отметить, что биочернила должны обладать рядом ключевых свойств, а именно пригодностью к печати и образованию в своей структуре поперечных связей (сшивок), а после полимеризации им должны быть свойственны достаточные механические свойства, обеспечивающие связь клеток с матрицей, их пролиферативную активность и способность к дифференцировке. Кроме того, биочернила должны обладать биосовместимостью, т. е. клетки в их составе должны сохранять способность к свойственным им специфическим ответам, а биочернила не должны оказывать на клетки деградирующее, инактивирующее действие. Более того, эти ожидаемые негативные свойства должны быть контролируемы.

Клетки. Для использования в биопечати различных клеток имеются широкие возможности. Применяются практически все типы соматических клеток, из которых построены ткани и органы, и прогениторные (стволовые клетки), которым еще предстоит стать соматическими. Для того чтобы сформировать миметические ткани или органы на макроуровне, клетки, используемые в биопечати, должны пролиферировать в составе биопечатного комплекса. При этом учитываются два важных обстоятельства: первое – насколько клетки в биочернилах по своим свойствам близки к физиологическому состоянию тех же клеток *in vivo*, второе – в какой степени и как долго клетки могут сохранять или изменять свойственные им *in vivo* функции. Искусственные ткани обычно создаются на основе обычных клеток и клеток поддержки или прогениторных клеток (стволовых клеток), способных к дифференцировке. Если речь идет об обычных клетках, то биопечать сталкивается с большими трудностями. Различные типы клеток, вводимые в один

и тот же гидрогель, должны печататься параллельно, т. е. для каждой печати нужно изготавливать свои биочернила. В таком случае контроль стадий принтинга в реальном времени естественным образом усложняется. Со стволовыми клетками свои проблемы. Хотя количество биочернил для каждого печатного события минимизируется, в чернила нужно добавлять гормоны роста или другие биоактивные сигнальные молекулы – стимуляторы дифференцировки. Проблемы возникают и с напечатанным продуктом. Подобранные факторы дифференцировки должны гарантировать протекание основного процесса дифференцировки и не оказывать никаких побочных эффектов, например изменения ее направления. А это бывает не всегда. Тем не менее, очевидно, что клетки для биопечати должны соответствовать самым высоким критериям чистоты и к биопечати практически непригодны те из них, которые после повреждения практически не регенерируют (например, кардиомиоциты).

Техника биопечати. На сегодняшний день, поскольку не существует единой техники биопечати, которая обеспечивала бы создание синтетических тканей всех уровней сложности, используют три технических типа биопечати – струйную, лазерную и микроэкструзионную (вытеснительную).

Струйная биопечать. Струйные принтеры были первыми устройствами, предназначенными для биопечати. Биочернила (гидрогель и клетки) помещаются в особую емкость – картридж, связанный с головкой прибора, через сопло которого биочернила поступают наружу на биобумагу. По сути дела, они представляют собой модифицированные версии обычных двухмерных струйных принтеров, заправляемых тонером. Просто тонер в картриджах струйного принтера заменен биологическим материалом, а бумага – управляемым электроникой поддоном, контролируемым положением печатающей головки. Головка в ходе биопечати находится под температурным или пьезоэлектрическим контролем специальных устройств, с помощью которых в канале головки под влиянием высокой температуры биочернила преобразуются в капли определенного (контролируемого) размера и выталкиваются из сопла. Нагревание биочернил в головке настолько краткосрочно, что это никак не сказывается на свойствах живых клеток. Для распыления жидкости на мелкие капли в головку встраивается пьезоэлектрический кристалл, который создает внутри ее звуковую волну с определенной частотой. Под напряжением пьезоэлектрический кристалл мгновенно меняет форму, создавая давление, необходимое для выбрасывания капель из сопла. Достоинствами струйного метода являются дешевизна самого прибора и высокая скорость печати. Благодаря нескольким головкам можно проводить параллельную печать при сохранении высокой (от 80 до 90 %) жизнеспособности клеток (см. рисунок) [14].



Схематическое представление принципов устройства и работы различных 3D-биопринтеров [14]

Schematic representation of device principles and operation of various 3D bioprinters [14]

Еще одним преимуществом струйных биопринтеров является их способность создавать градиент концентрации клеток, тканей или факторов роста по всей площади 3D-структуры посредством изменения размеров и плотности капель. Вместе с тем головки представляют собой микроэлектромеханические системы термального и пьезоэлектрического воздействия, вследствие которого в области сопла при его открытии имеют место небольшие деформации, вызывающие образование в биочернилах пузырьков. Через сопло не проходят биочернила с высокой вязко-

стью (т. е. содержащие большое количество клеток), поэтому оно часто засоряется. Кроме того, клетки постепенно оседают в картридже и закупоривают сопло. Чтобы уйти от этой проблемы, сконструированы новые биопринтеры, в головку которых встроен особый сканнер с диспенсером. И наконец, в картриджи первых струйных биопринтеров ввиду их небольшого объема можно было загрузить лишь небольшое количество биочернил, что явно препятствовало проведению продолжительных экспериментов. Реконструкция струйных принтеров проводилась и в этом направлении. Тем не менее для первых струйных принтеров было характерно разрешение между каплями в 10 мкм, а объем отдельной капли составлял порядка 20 пл. Так как размер капель и частота их выброса в струйном принтере контролируются электроникой, объем капель составляет от 1 до 300 пл, а частота подачи – от 1 до 10 000 капель в секунду. На выходе из капель формируются линейные структуры шириной 50 мкм, каждая из которых содержит по одной-две клетки.

Лазерная биопечать. Лазерная биопечать, или, точнее говоря, лазер-опосредованная биопечать (laser-assisted bioprinting), возникшая почти одновременно с бумом в области лазерных технологий, основана на принципах прямого лазер-индуцированного переноса, впервые разработанного для металлов. Впоследствии она была успешно применена для биологического материала – пептидов, ДНК и клеток [15]. Типичное лазерное устройство состоит из импульсного лазерного источника, фокусирующей системы, «ленты», изготовленной, как правило, из стекла, покрытого лазер-поглощающим слоем (например, частицами золота или титана) и слоем биологического материала (например, клетками и/или гидрогелем), приготовленного в виде жидкого раствора, и принимающего субстрата перед лентой.

Итак, ключевая часть лазерного биопринтера (см. рисунок) – это так называемый донорский слой, который чувствителен к лазерному облучению. При печати лазерные импульсы стимулируют исчезающе малые участки поглощающего слоя. Под влиянием лазерного воздействия участок донорского слоя вскипает, создавая в слое пузырек с высоким давлением внутри на интерфейсе со слоем биочернил. Затем пузырек продвигается в объеме биочернила. Падающие капли собираются в субстратном слое и сшиваются между собой. По сути дела, это бесконтактная печать, не вызывающая у клеток механического стресса, способного привести к большой вариабельности состояний в клеточном пуле.

Разрешение лазерной биопечати зависит от многих факторов, в том числе от плотности лазерного потока (энергии, приходящейся на единицу площади), поверхностного натяжения, смачиваемости подложки, воздушного зазора между лентой и субстратом, а также толщины и вязкости биологического слоя. Поскольку в лазерной биопечати не используется насадка-сопло, удастся избежать засорения конечного продукта клетками или материалом. Лазерная биопечать совместима с жидкостями различной вязкости (1–300 мПа/с) и может печатать клетки млекопитающих, практически не влияя на их жизнеспособность и функциональную активность. При этом технология с использованием лазера с частотой импульсов 5 кГц и скоростью до 1600 мм/с обеспечивает плотность клеток в конечном продукте до 10^8 кл/мл с разрешением 1 клетка на каплю. Однако, несмотря на ряд преимуществ, лазерная биопечать создает и некоторые трудности, связанные с низкой скоростью гелеобразования, что приводит к относительно низкой скорости потока в целом. Для каждого из печатаемых типов клеток или гидрогеля требуется индивидуальная лента, что отнимает много времени, если несколько типов клеток и/или материалов должны быть расположены вместе. Наконец, в конечной биопечатной продукции присутствуют металлические остатки вследствие испарения металлического лазер-поглощающего слоя во время печати. Избежать этого загрязнения можно, используя неметаллические поглощающие слои и модифицируя процесс печати.

К сожалению, лазерные системы для биопечати оказались очень дорогими, и это явилось серьезным сдерживающим фактором их применения на практике. Высокая стоимость лазерных систем стала ощутимой проблемой для исследований в области тканевой инженерии, хотя, как это часто бывает, с развитием лазерных технологий эта стоимость может быстро снижаться.

Микроэкструзионная биопечать. Микроэкструзионная (или экструзионная) печать является модификацией струйной. Микроэкструзионные биопринтеры обычно состоят из нагревательного элемента, системы подачи, одного или двух предметных столиков, способных двигаться по

осям x , y и z , оптоволоконного источника света для освещения области печати и/или для фотоактивации, видеокамеры для x - y - z команд и контроля, а также пьезоэлектрического увлажнителя (см. рисунок). В некоторых системах для ускорения серийной печати ряда заготовок используется несколько печатных головок. Поскольку печать на струйных принтерах с использованием вязких биочернил невозможна, для преодоления этого недостатка в головку экструзионного принтера встроен воздушный насос или винтовой поршень, чтобы проталкивать биочернила через сопло. Используя постоянное давление на биочернила, принтер печатает непрерывные полосы, а не отдельные капли. Множество материалов совместимы с микроэкструдорами, включая гидрогели, многие полимеры и клетки-сфероиды. Следовательно, почти все типы гидрогелей – предшественников полимеров различной вязкости, так же как и клеточные агрегаты с высокой клеточной плотностью, могут печататься экструзионными принтерами. При печати большого количества биопродуктов эти принтеры могут оказывать сильное механическое воздействие на капсулированные клетки, что, по-видимому, влияет на жизнеспособность последних. Механическая система подачи дает более точный контроль над потоком материала, так как в пневматических системах имеет место задержка выхода сжатого газа. Пневматические принтеры обладают важным преимуществом, заключающемся в простоте системы подачи материала, а их мощность ограничена лишь силой давления воздуха в системе. Механические системы содержат встроенные сложные устройства небольших размеров, позволяющие осуществлять точный пространственный контроль, правда, в ущерб максимальной мощности.

Жизнеспособность клеток после микроэкструзионной биопечати более низкая, чем при струйной биопечати; частота выживания клеток находится в пределах 40–86 % и уменьшается с увеличением давления экструдора и калибра сопла. Уменьшение жизнеспособности клеток в биочерниле в ходе микроэкструзии, вероятнее всего, является результатом стресса клеток при их движении в вязких жидкостях. Возможно, давление в системе подачи может оказывать более существенное влияние на жизнеспособность клеток, чем диаметр сопла. Хотя жизнеспособность клеток может поддерживаться при помощи низких давлений и применения сопел широких размеров, недостатком этих биопринтеров является сильная потеря разрешающей способности и скорости печати. Небиологические микроэкструзоры способны печатать с разрешением 5–200 мкм при скорости в 10–50 мкм/с.

Т а б л и ц а 1. Характеристики струйного, экструзионного и лазерного 3D-биопринтеров [14]

T a b l e 1. Characteristics of inkjet, extrusion and laser 3D bioprinters [14]

Характеристика	Струйный биопринтер	Экструзионный биопринтер	Лазерный биопринтер
Стоимость	Низкая	Умеренная	Высокая
Жизнеспособность клеток, %	>85	40–80	>95
Скорость печати	Высокая	Низкая	Средняя
Поддерживающая вязкость биочернил	3,5–12 мПа/с	От 30 до $6 \cdot 10^7$ мПа/с	От 1 до 100 мПа/с
Разрешение	Высокое	Умеренное	Высокое
Качество вертикальной структуры	Низкое	Хорошее	Среднее
Плотность клеток	Низкая ($<10^6$ клеток/мл)	Высокая (клеточные сфероиды)	Средняя ($<10^8$ клеток/мл)
Наиболее подходящий материал для биочернил	Альгинат, наночастицы полиэтиленгликольдиметакрилата (PEGDMA), коллаген	Альгинат, гельМА, коллаген	Коллаген, матригель
Опубликованные примеры использования	Тканевая инженерия (кровеносные сосуды, костная ткань, хрящевая ткань, нейроны)	Тканевая инженерия (кровеносные сосуды, костная ткань, хрящевая ткань, нейроны, мышцы, опухоли) Контролируемый выброс биомолекул, чипированные органы	Тканевая инженерия (кровеносные сосуды, костная ткань, кожа, жировая ткань)

Достижимы ли эти параметры биопечати при сохранении жизнеспособности клеток и их функционального состояния? Ответ на этот вопрос должен быть получен в ближайшем будущем. Работы в этом направлении ведутся, так как достижение физиологической плотности клеток в тканеинженерных системах – основная задача биопечати. Нередко при микроэкструзионной биопечати 3D-тканей используются биочернила, практически состоящие из клеток сфероидов. При биопечати сфероиды накладываются друг на друга и самоорганизуются в необходимую 3D-структуру.

Микроэкструзионные биопринеры использовались для создания многих типов тканей, включая клапаны аорты, разветвленные сосудистые системы и модели фармакокинетики *in vitro*, а также модели опухолей. Хотя на изготовление сложных объектов с высоким разрешением может уходить много времени, данная технология позволяет создавать макроткани, применимые в клинической практике, или микроткани для экспериментальной работы.

В табл. 1 приведены характеристики описанных выше типов 3D-печати, анализ которых позволяет сделать вывод о предпочтительности того или иного ее типа для решения конкретных задач, стоящих перед биологией и медициной.

Примеры практического применения биопечати. Биопечать позволяет комбинировать клетки с различающимися по своей природе, натуральными или синтетическими биочернилами, создавать каркасные (скаффолды) и бескаркасные конструкции. Для этого используют различные клетки – недифференцированные стволовые клетки и дифференцированные соматические клетки тканей и органов. Выбор клеток для 3D-биопечати тканей или органов – важнейшее условие их правильного функционирования в напечатанном материале. В организме ткани и органы состоят из многочисленных (порядка 200) типов клеток с особыми и необходимыми биологическими свойствами, которые должны быть воспроизведены и в трансплантируемой ткани. К тому же кроме основного функционирующего типа клеток каждая ткань содержит клетки, обеспечивающие опорную, структурную и барьерную функции, которые необходимы для васкуляризации или создания оптимальной микросреды для дифференцировки резидентных стволовых клеток. В табл. 2 приведены примеры биопечати различных тканей.

Т а б л и ц а 2. Примеры напечатанных тканей [14]

T a b l e 2. Examples of bioprinted tissues [14]

Ткань	Источник клеток	Материалы биочернил	Метод биопечати
Кровеносные сосуды	Гладкомышечные клетки Клетки аортальных клапанов Эндотелиальные клетки вен Эндотелиальные клетки сердца	Углеродные трубки и альгинат Желатин и альгинат Полиэтиленгликоль Альгинат	Экструзионный Экструзионный Экструзионный Экструзионный
Костная ткань	Остеобласты мыши Остеопрогениторные клетки человека	Наногидроксиапатит Наногидроксиапатит	Струйный Лазерный
Хрящевая ткань	Хрящевые клетки Хондроциты и МСК	Поликапролактан Гидрогель на основе фибрина и коллагена	Струйный Экструзионный
Нервная ткань	Стволовые клетки костного мозга, эмбриональные стволовые клетки	Коллаген и агароза Наногидроксиапатит	Экструзионный Струйный
Скелетная мускулатура	Миобласты мыши	Полиуретан и PCL техника	Экструзионный
Жировая ткань	МСК жировой ткани	Альгинат	Лазерный

Жировая ткань. Данная ткань выполняет в организме роль депо липидов и жира и содержит по сравнению с другими тканями достаточно большое количество МСК. Полученный при 3D-печати с использованием МСК продукт точно имитировал архитектуру натуральной жировой ткани. Он был создан с помощью лазерной биопечати с использованием МСК из жировой ткани и биочернил, представляющих собой смесь альгината и сыворотки крови [16]. Ткань хранилась без изменений в течение 21 дня. В ней синтезировались липиды и экспрессировались адипогенные маркеры LPL, aP2 и PPAR- γ 2.

Кровеносные сосуды. Кровеносная сосудистая сеть обеспечивает транспорт кислорода, питательных веществ, а также удаление отходов метаболизма из тканей. Поэтому создание в систе-

мах биопечати сети васкуляризации имеет принципиальное значение для поддержания жизнедеятельности и минимизации гипоксии в трансплантируемых тканях и органах. Решение данной задачи при биопечати часто сталкивается с непреодолимыми трудностями, связанными в первую очередь с отсутствием соответствия между длиной отдельных сосудов и временными характеристиками доставки кислорода в систему, что в конечном счете приводит к кислородному голоданию и некрозу печатного продукта [12]. Причина кроется чаще всего в лабильности биочернил. Манипулируя носителями, все же удалось получить неплохие результаты. Так, например, применяя силикон и желатин метакрилат, удалось получить в конструкции 100 мкм каналы. В других опытах в полученной искусственной ткани обнаруживались каналы длиной в 1 см, перфузия через которые сохранялась в течение 6 недель. Успешным оказалось и добавление к чернилам тромбина и фибриногена, что способствовало образованию экстрацеллюлярного внутриклеточного матрикса и, как следствие, формированию разнообразной геометрии сосудов [12].

Костная ткань. Костная ткань включает в себя остециты, остеобласты и остеокласты, образующие кортикальный (наружный) и губчатый (внутренний) слои кости, межклеточный матрикс и минеральные соединения. На взаимодействии между этими структурными компонентами базируются созревание, дифференцировка, ремоделирование и резорбция костной ткани. Эндостом разделяет кортикальный и губчатый слои друг от друга с помощью надкостницы, покрывающей наружную поверхность. Послеродовая кость формирует свои механические свойства через обновление и ремоделирование. 3D-биопечать решает основную задачу – создание нового каркаса (скаффолда) с инкорпорированными в него клетками и факторами роста с сохранением пространственно-временной диффузии [12]. Например, струйная печать копирует костный морфогенетический белок на поверхности фибрина, направляя стволовые клетки в костную ткань. Чрезвычайно важной представляется структура биочернил. Так, Венц с сотр. [12] использовали полимерные биочернила на основе метакрилата желатина и метакрилата гиалуроновой кислоты с частицами гидроксиапатита. С помощью микроэкструзионного биопринтера авторы получили структуры, которые ремоделировались в костный матрикс. В другой работе было показано, что при биопринтинге МСК жировой ткани распределяются внутри 3D-структуры костной ткани. Данная структура характеризовалась высокой жизнеспособностью клеточных компонентов на фоне формирования костного матрикса.

Хрящевая ткань. Хрящевая ткань – это разновидность опорно-трофических тканей, состоящих из хрящевых клеток и плотного межклеточного матрикса. Хрящевая ткань выполняет механическую функцию, покрывая суставные поверхности, осуществляет амортизацию и перераспределение сил сжатия и растяжения в суставах, повышает их устойчивость к износу. Хрящевая ткань обладает ограниченной регенеративной способностью, что часто требует длительного времени для восстановления, и подвержена воспалительным изменениям и травматизму, приводящим к протезированию [17]. 3D-печать позволяет создавать хрящевые трансплантаты, отличающиеся точной пространственной геометрией [10]. В опытах использовали прогениторные клетки, выделенные из хрящевой ткани, МСК и хондроциты с желатинметакрилатом в качестве носителя. Трансплантаты наблюдались в течение 56 дней. Судя по содержанию в образцах гликозоаминогликана, все типы клеток претерпевали хондрогенную дифференцировку, причем МСК превращались в основном в хондроциты. Гидрогель в биочернилах стимулировал образование в образцах типичного для хрящевой ткани экстрацеллюлярного клеточного матрикса и синтез специфических коллагена II и агрекана. Кроме желатинметакрилата в биочернила добавляли сульфат метакрилатхондроитина и альгинат, образующие Ca^{2+} -сшивки. При этом время экструзии при биопечати сокращалось, а гидрогелевая основа биочернил стабилизировалась. Через несколько дней альгинат в конструкции разрушался, а Ca^{2+} -зависимые сшивки между компонентами оставались без изменения [17].

Миокард и сердечные клапаны. Сердечно-сосудистые заболевания, несмотря на последние успехи в области кардиологии и кардиохирургии, остаются главной причиной смертности. Инфаркт миокарда – наиболее частая причина сердечной недостаточности – происходит в результате образования бляшек в артериях и венах, блокирующих кровотоки, снабжающий сердеч-

ную ткань кислородом и питательными веществами, что и приводит к ишемии и гибели кардиомиоцитов. Поскольку кардиомиоциты практически не обладают регенеративной способностью, в области инфаркта образуется соединительнотканый рубец. На фоне трансплантации сердца, введения в систему кровеносных сосудов стентов и даже прямых инъекций кардиомиоцитов в очаг поражения все большее внимание привлекают работы в области биопечати кардиальных трансплантатов. Чаще всего в качестве натуральных гидрогелей для нужд кардиальной тканевой регенерации используются коллаген, фибрин и матригель, а среди синтетических – полиэтиленгликоль, полиакриламид и поли-2-гидроксиэтилметакрилат. Преимуществом обоих типов гидрогелей является возможность их смешивания в различных пропорциях.

Продуктом 3D-биопечати являются так называемые кардиальные фрагменты – скаффолды, пропитанные жизнеспособными клетками, которые обычно имплантируются *in vivo* в пораженную область сердца. Данные фрагменты представляют собой пластинки из связанных между собой клеток или суспензию клеток в скаффолде, которая сходна с экстрацеллюлярным клеточным матриксом. Через несколько недель после имплантации полые фибриновые трубки с неонатальными кардиомиоцитами проявляют нормальные кардиальные функции. По сведениям Хуанга с соавт., фибриновые трубки сохраняют свою контрактильность до 2 мес. [14]. Появились данные и об использовании индуцированных стволовых клеток (иПСК), получены бескаркасные биопринты, включающие плюрипотентные иПСК, кардиальные фибробласты и UVES-клетки. Эти фрагменты начинают спонтанно сокращаться в иммуноослабленном сердце мыши [9]. Со временем во фрагментах возникают отдельные кровеносные сосуды, которые, однако, не в состоянии обеспечить оптимальный транспорт питательных веществ к клеткам. Отмечается, что более жизнеспособны тонкие тканеинженерные продукты, которые могут интегрироваться с кардиальной системой подвергнутого имплантации сердца.

Аортальные клапаны обеспечивают бесперебойную работу сердца, регулируя кровоток в аорте и кровеносных сосудах. Наиболее часто встречающаяся патология клапанов – их стеноз и недостаточность. Стеноз заключается в неполном открытии сердечных клапанов вследствие слипания или утолщения створок, что приводит к дополнительной нагрузке на сердце. Недостаточность клапанов наблюдается, когда они полностью не закрываются, что приводит к регургитации, или движению крови в обратном направлении.

В настоящее время в кардиохирургии для замены искусственных аортальных клапанов применяется транскатетеризация. Недостатком этой операции является несовершенная подгонка размеров и геометрии имплантата. Тканевая инженерия предлагает альтернативную стратегию борьбы с этим недугом, хотя работы в этом направлении еще не получили клинического применения. Причиной этого является отсутствие биоматериалов, которые в состоянии испытывать физиологическое давление в течение длительного времени.

Печень. Печень – наиболее важный орган, определяющий функционирование всего организма. Ткань печени включает в себя гепатоциты, метаболизирующие чужеродные химические соединения и продуцирующие белки. В ней образуется гликоген – главный источник поддержания постоянной концентрации глюкозы в крови. В печени синтезируются важнейшие белки плазмы крови: фибриноген, альбумины, протромбин и др. Гепатоциты составляют основную массу клеточного материала, обеспечивающего функцию органа. Кроме того, ткань печени обогащена так называемыми синусоидными капиллярами, через которые осуществляется локальное кровоснабжение. Они выстланы внутри эндотелиоцитами, между которыми локализованы звездчатые клетки Купфера, макрофаги, контролирующие воспалительные процессы в органе. Главным отходом функционирования печени является желчь. Заболевания печени часто связаны с действием на нее токсических соединений.

Использование моделей печени снизило бы побочные действия на ее функцию все новых и новых лекарственных соединений. Ли с соавт. [18] использовали для биопечати модели печени биочернила с эмбриональными стволовыми клетками, МСК жировой ткани и раковыми клетками печени и коллагена как носителя биочернил, обработав полученные данные с помощью компьютерного PCL подхода. О воспроизводстве печеночных функций свидетельствовали данные о содержании в образцах белков и мочевины. В биопродукте экспрессировались также специфич-

ческие печеночные транскрипционные факторы. Другими авторами [14] использовались в опытах ИПСК, дифференцированные в прогениторные клетки печени, эндотециоциты и МСК как основной структурный материал. Продукты биопечати напоминали по строению печеночные дольки, в них также экспрессировались печеночные маркеры. По мнению авторов, биопринты печени найдут применение при оценке токсичности различных химических соединений.

Мышечная ткань. Тканевая инженерия скелетной мускулатуры предполагает большой прогресс при замене патологически измененной или поврежденной мышечной ткани [19]. В первых опытах для создания скаффолда в качестве биочернил использовался костный морфогенетический белок, иммобилизованный на фибрине, в которых МСК дифференцировались в клетки мышечной ткани. В других опытах с использованием струйного биопринтера биочернила содержали гораздо большее число клеток: МСК собаки и человека, бычьи эндотециоциты и альгинат в качестве наполнителя [20]. В напечатанной ткани клетки пролиферировали, соответствовали фенотипическим характеристикам и физиологическим параметрам, после имплантации биоконструкции васкуляризировались. Использование экструзионной биопечати привело к обнадеживающим результатам. Для получения тканевых образцов гладкой мышечной мускулатуры применялись МСК жировой ткани, запущенные в процесс мышечной дифференцировки, и желатин как носитель. Клетки в биообразцах пролиферировали, обнаруживали надежную жизнеспособность и через 3 дня инкубации экспрессировали маркерный белок актин. Предполагается также эффективность тканевой инженерии при повреждениях мышечной ткани, сопряженных с большими тканевыми дефектами.

Нервная ткань. Хотя в области клеточной терапии самых разнообразных заболеваний нервной системы достигнут ощутимый прогресс, 3D-печать делает только первые шаги. Так, комбинируя различные биоматериалы, стволовые и нервные клетки, удалось создать 3D-печатные конструкции со специфическими характеристиками нервной ткани [14]. В качестве наполнителя биочернил использовали полиуретан, в который помещали стволовые клетки нервной ткани мыши. Их инкапсулировали в 25 %-ном растворе полиуретана и печатали многослойные структуры (до 8 тонких слоев толщиной 1,5 мм каждый). Биопечать длилась около 24 ч, при этом жизнеспособность клеток не падала ниже 50 %, а в конструкциях регистрировался маркер β -тубулин III. Напечатанные конструкции сохраняли свои свойства после трансплантации в поврежденный мозг карпа. В другой работе биочернила содержали 5 % альгината, 5 % карбоксиметилхитозана, 1,5 % агарозы и нервные стволовые клетки человека. В конструкциях идентифицировали GABA-нервные клетки и клетки глии. Функциональность тканей оценивали по кальциевому ответу (кальциевым спайкам) нейронов, вызванному действием GABA-ингибитора бикакулина.

Поджелудочная железа. Природная поджелудочная железа представляет собой васкуляризованный многочленный 3D-структурный комплекс, выполняющий эндокринную и экзокринную функции. В островках железы содержатся эндокринные α -, β -, σ -, γ - и ϵ -клетки, продуцирующие гормоны. Клетки α и β контролируют содержание глюкозы в крови с помощью гормонов глюкагона и инсулина, σ -клетки синтезируют соматостатин, который ингибирует активность α - и β -клеток, а ϵ -клетки выделяют грелин и регулируют потребление энергии и аппетит. Диабет первого типа возникает при истощении пула β -клеток. Учитывая изложенное выше, тканевая инженерия должна обеспечить трансплантацию β -клеток, панкреатической ткани, донорского клеточного и тканевого материала и преодоление иммунной реакции организма. 3D-печать в состоянии предложить оборудование и биологический материал для создания панкреатических моделей, содержащих точное количество пространственно упорядоченных клеток. В качестве носителей биочернил использовали желатин, альгинат и фибриноген, а в роли биологического материала выступали островки Лангерганса. Установлено, что трипептид аргинин-глицин-аспартат, добавленный к биочернилам, повышает адгезию компонентов в составе биоконструкции. Получены позитивные результаты и при введении в биочернила стволовых клеток, содержащих полимер молочной кислоты. К сожалению, опыты по биопечати поджелудочной железы ограничиваются лабораторными исследованиями [14].

Перспективы развития тканевой инженерии. Нами приведен далеко не полный перечень использования 3D-печати в биологических исследованиях и клинической практике. Кратко опи-

саны принципы работы струйной, экструзионной и лазерной 3D-биопечати. Очевидно, что прогресс в данной области ограничивается небольшим количеством применяемых в качестве наполнителей материалов в составе биочернил, их оптимальным подбором при использовании в биочернилах, разрешающей способностью напечатанных конструкций. Индукция васкуляризации в образцах представляется очень важной для дальнейшего использования биопродукции в медицине. Недостатки тканевых технологий являются мощным импульсом для совершенствования 3D-биопечати и в первую очередь в плане разработки более сложного оборудования, позволяющего ускорить процесс печати, получить большее количество напечатанного материала, сохраняющего жизнеспособность клеток в течение достаточно длительного времени и позволяющего быстро оценивать маркерные и физиологические свойства биопринтов. Ведутся также исследования по разработке более оптимальных составов биочернил, что является одним из приоритетных направлений в решении данной проблемы. Можно не сомневаться, что в будущем на замену донорских органов придут тканеинженерные технологии, основанные на клеточном материале пациентов. Это позволит не только восполнять в организме тканевые дефекты, но и печатать, а затем трансплантировать целые органы. На первый взгляд данные перспективы кажутся фантастическими, но практика показывает, что это далеко не так. Мы все являемся свидетелями необычайно бурного развития биологии и медицины, и это очень обнадеживает.

Список использованных источников

1. AlGhamdi, K. M. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells / K. M. AlGhamdi, A. Kumar, N. A. Moussa // *Lasers Med. Sci.* – 2012. – Vol. 27, N 1. – P. 237–249. <https://doi.org/10.1007/S10103-011-0885-2>
2. Tsoulfas, G. 3D printing applications in medicine and surgery / G. Tsoulfas, P. I. Bangeas, J. Suri. – Amsterdam : Elsevier, 2020. – 185 p.
3. Wüst, S. Controlled positioning of cells in biomaterials – approaches towards 3D tissue printing / S. Wüst, R. Müller, S. Hofmann // *J. Funct. Biomater.* – 2011. – Vol. 2, N 3. – P. 119–154. <https://doi.org/10.3390/jfb2030119>
4. 3D printing in medicine. A practical guide for medical professionals / eds. : F. J. Rybicky, G. T. Grant. – Cham : Springer Nature, 2017. – 138 p.
5. Zorlutuna, P. The expanding world of tissue engineering: the building blocks and new applications of tissue engineered constructs / P. Zorlutuna, N. E. Vrana, A. Khademhosseini // *IEEE Rev. Biomed. Eng.* – 2013. – Vol. 6. – P. 47–62. <https://doi.org/10.1109/RBME.2012.2233468>
6. 3D printing of human tissue: biofabrication, bioinks, bioreactors / J. Zhang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 8. – P. 3971–3992. <https://doi.org/10.3390/ijms22083971>
7. Zhu, J. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds / J. Zhu, R. T. Marchant // *Exp. Rev. Med. Devices.* – 2011. – Vol. 8, N 5. – P. 607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>
8. Layer-by-layer build-up of polysaccharide-containing films: physico-chemical properties and mesenchymal stem cells adhesion / V. I. Kulikouskaya [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2018. – Vol. 106, N 8. – P. 2093–2104. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36408>
9. Биополимерные мультислойные пленки в качестве носителей мезенхимальных стволовых клеток / В. И. Куликовская [и др.] // *Докл. НАН Беларуси.* – 2017. – Т. 61, № 3. – С. 38–46.
10. Fabrication and characterization of ultrathin spin-coated poly (L-lactic acid) films suitable for cell attachment and curcumin loading / V. Kulikouskaya [et al.] // *Biomed. Mater.* – 2020. – Vol. 15, N 6. – Art. 065022. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aba40a>
11. *Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting* / S. Wüst [et al.] // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.016>
12. Skeldon, G. Three-dimension bioprinting of stem cells derived tissues for human regenerative medicine / G. Skeldon, B. Lucendo-Villarin, W. Shu // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* – 2018. – Vol. 373. – Art. 20170224. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0224>
13. *Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid* / D. F. D. Campos [et al.] // *Biofabrication.* – 2012. – Vol. 5, N 1. – Art. 015003. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015003>
14. 3D bioprinting for engineering complex tissues / C. Mandrycky [et al.] // *Adv. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 34, N 4. – P. 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
15. Guillotin, B. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication / B. Guillotin, F. Guillemot // *Trends Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29, N 4. – P. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.008>
16. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells / M. Gruene [et al.] // *Biofabrication.* – 2011. – Vol. 3, N 1. – Art. 015005. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/1/015005>
17. *In vivo* chondrogenesis in 3D bioprinted human cell-laden hydrogel constructs / T. Möller [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* – 2017. – Vol. 5, N 2. – P. e1227. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001227>

18. Development of liver decellularized extracellular matrix bioink for three-dimensional cell printing-based liver tissue engineering / H. Lee [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2017. – Vol. 18, N 4. – P. 1229–1237. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01908>

19. Tissue-engineered heart valves / E. Filova [et al.] // *Physiol. Res.* – 2009. – Vol. 58, N 2. – P. S141–S158. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931919>

20. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology / T. Xu [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, N 1. – P. 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.035>

References

1. AlGhamdi K. M., Kumar A., Moussa N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in Medical Science*, 2012, vol. 27, no. 1, pp. 237–249. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2>

2. Tsoulfas G., Bangeac P. I., Suri J. *3D printing applications in medicine and surgery*. Amsterdam, Elsevier Publ., 2020. 185 p.

3. Wüst S., Müller R., Hofmann S. Controlled positioning of cells in biomaterials – approaches towards 3D tissue printing. *Journal of Functional Biomaterials*, 2011, vol. 2, no. 3, pp. 119–154. <https://doi.org/10.3390/jfb2030119>

4. Rybicky F. J., Grant G. T. (eds.). *3D printing in medicine. A practical guide for medical professionals*. Cham, Springer Nature, 2017. 138 p.

5. Zorlutuna P., Vrana N. E., Khademhosseini A. The expanding world of tissue engineering: the building blocks and new applications of tissue engineered constructs. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 2013, vol. 6, pp. 47–62. <https://doi.org/10.1109/RBME.2012.2233468>

6. Zhang J., Wehrl E., Rubert M., Miller R. 3D printing of human tissue: biofabrication, bioinks., bioreactors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 8, pp. 3971–3992. <https://doi.org/10.3390/ijms22083971>

7. Zhu J., Marchant R. T. Design properties of hydrogel tissues-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, 2011, vol. 8, no. 3, pp. 607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>

8. Kulikouskaya V. I., Pinchuk S. V., Hileuskaya K. S., Kraskouski A. N., Vasilevich I. B., Matievski K. A., Agabekov V. E., Volotovskii I. D. Layer-by-layer build-up of polysaccharide-containing films: Physico-chemical properties and mesenchymal stem cells adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2018, vol. 106, no. 8, pp. 2093–2104. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36408>

9. Kulikouskaya V. I., Pinchuk S. V., Hileuskaya K. C., Kraskouski A. N., Vasilevich I. B., Matievski K. A., Agabekov V. E., Volotovskii I. D. Biopolymer multilayer films as a carriers of mesenchymal stem cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus], 2017, vol. 61, no. 3, pp. 38–46 (in Russian).

10. Kulikouskaya V., Chyshankou I., Pinchuk S., Vasilevich I., Volotovskii I., Agabekov V. Fabrication and characterization of ultrathin spin-coated poly (L-lactic acid) films suitable for cell attachment and curcumin loading. *Biomedical Materials*, 2020, vol. 15, no. 6, art. 06502. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aba40a>

11. Wüst S., Godla M. E., Müller R., Hofmann S. Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting. *Acta Biomaterialia*, 2014, vol. 10, no. 2, pp. 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.016>

12. Skeldon G., Lucendo-Villarin B., Shu W. Three-dimension bioprinting of stem cells derived tissues for human regeneration medicine. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2018, vol. 373, art. 20170224. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0224>

13. Campos D. F. D., Blaeser A., Weber M., Jäkel J., Neuss S., Jahn-Dechent W., Fischer H. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication*, 2012, vol. 5, no. 1, art. 015003. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015003>

14. Mandrycky C., Wang Z., Kim K., Kim D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 2016, vol. 34, no. 4, pp. 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>

15. Guillotin B., Guillemot F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. *Trends Biotechnology*, 2011, vol. 29, no. 4, pp. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.008>

16. Gruene M., Pflaum M., Deiwick A., Koch L., Schlie S., Unger C., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B. N. Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. *Biofabrication*, 2011, vol. 3, no. 1, art. 015005. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/3/1/015005>

17. Möller T., Amoroso M., Haegg D., Brautsing C., Rotter N., Apeltgren P., Lindahl A., Kochley L., Gatenholm P. In vivo chondrogenesis in 3D bioprinted human cell-laden hydrogel constructs. *Plastic and Reconstructive Surgery. Global Open*, 2017, vol. 5, no. 2, p. e1227. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001227>

18. Lee H., Han W., Kim Y., Ha D-H., Jang J., Kim B. S., Cho D-W. Development of liver decellularized extracellular matrix bioink for three-dimensional cell printing-based liver tissue engineering. *Biomacromolecules*, 2017, vol. 18, no. 4, pp. 1229–1237. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01908>

19. Filova E., Straka F., Mirejovsky T., Masin J., Bacakova L. Tissue-engineered heart valves. *Physiological Research*, 2009, vol. 58, no. 2, pp. S141–S158. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931919>

20. Xu T., Zhao W., Zhu J-M., Albanna M. Z., Atala A. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, 2013, vol. 34, no. 1, pp. 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.035>

Информация об авторах

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com

Пинчук Сергей Владимирович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchuksv@mail.ru

Information about the authors

Igor D. Volotovski – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: volotovski@yahoo.com

Sergei V. Pinchuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchuksv@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ
SCIENTISTS OF BELARUS

АНАТОЛИЙ ИВАНОВИЧ ЗИНЧЕНКО
(К 75-летию со дня рождения)

28 ноября 2021 г. исполнилось 75 лет со дня рождения известного ученого в области биотехнологии соединений нуклеиновой природы, члена-корреспондента НАН Беларуси (2000), доктора биологических наук (1993), профессора (2006), заведующего лабораторией молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси Анатолия Ивановича Зинченко.

Родился Анатолий Иванович в шахтерском поселке Щеголовка Сталинской (ныне Донецкой) области (Украина). Трудовой путь начал слесарем на Минском тракторном заводе (1963–1965 гг.). В 1970 г. окончил с отличием биолого-почвенный факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, а в 1973 г. – аспирантуру биологического факультета МГУ, успешно защитив кандидатскую диссертацию. В 1974–1982 гг. работал старшим инженером, младшим, старшим научным сотрудником Института биоорганической химии АН БССР. С 1982 г. научная жизнь А. И. Зинченко неразрывно связана с Институтом микробиологии НАН Беларуси, где он прошел путь от старшего научного сотрудника (1982) до заведующего лабораторией Института (с 1989 г. по настоящее время).



Увлеченность наукой у Анатолия Ивановича зародилась в годы учебы в МГУ под влиянием общения с профессорами Томасом Иосифовичем Тихоненко, Вадимом Израилевичем Аголом и Иосифом Григорьевичем Атабековым, которые организовали на биолого-почвенном факультете МГУ кафедру вирусологии. Со студенческой скамьи Анатолия Ивановича больше всего привлекали медицинские приложения молекулярной биологии.

Основными направлениями его научно-практической деятельности являются конструирование высокоактивных штаммов бактерий – сверхпродуцентов ферментов нуклеинового обмена, разработка биотехнологии получения природных и модифицированных нуклеотидов и нуклеозидов, востребованных в производстве фармакологически важных соединений и реагентов для ПЦР. А. И. Зинченко инициированы исследования по геной инженерии микроорганизмов. Им же опубликована первая в Республике Беларусь экспериментальная работа в этой области. В последнее десятилетие под его руководством сконструировано более 30 рекомбинантных штаммов микроорганизмов.

А. И. Зинченко была создана научная школа «Биотехнологии соединений нуклеиновой природы». Необходимость ее создания была обусловлена растущей потребностью здравоохранения республики в отечественных противовирусных и противоопухолевых лекарственных препаратах на основе нуклеиновых кислот и их структурных компонентов.

Разработки Анатолия Ивановича дважды входили в топ-10 результатов ученых НАН Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований.

Фундаментальные исследования, проводимые А. И. Зинченко, легли в основу разработанных совместно с Институтом биоорганической химии НАН Беларуси (ИБОХ НАН Беларуси) оригинальных химико-ферментативных технологий получения лекарственных субстанций высокоэффективных отечественных противоопухолевых препаратов «Лейкладин» и «Флударабел». В 2004 г. за данный цикл работ А. И. Зинченко совместно с коллегами удостоен Государственной премии Республики Беларусь в области науки и техники. Ежегодно по технологиям, разработанным под руководством А. И. Зинченко, выпускаются и поставляются в НПЦ «ХимФармСинтез» ИБОХ НАН Беларуси рекомбинантные нуклеозидфосфорилазы, которые обеспечивают промышленное производство отече-

ственных препаратов для терапии лейкозов и рассеянного склероза. А. И. Зинченко совместно с учеными из ИБОХ НАН Беларуси был установлен молекулярный механизм активации ключевого биокатализатора в синтезе компонентов нуклеиновых кислот (пурипнуклеозидфосфорилазы), позволивший определить исходные нуклеозиды для создания лекарственных препаратов с противоопухолевой и противовирусной активностью и синтезировать фармакологически перспективные фторпроизводные дезокси- и дидезоксинуклеозидов (топ-10 за 2015 г.).

А. И. Зинченко предложена идея устранения защиты рака от хозяйского иммунитета с помощью фермента аденозиндезаминазы, слитой с белком аннексином-А5. Впервые в Беларуси с использованием генно-инженерной техники созданы рекомбинантные штаммы бактерий – продуценты аденозиндеградирующих ферментов, слитых с человеческим белком, который при введении в организм человека и животных связывается только с раковыми клетками. Полученные результаты исследования открывают возможность создания оригинальных таргетных биопрепаратов, способных снять аденозиновую блокаду опухоли и «разбудить» собственный противораковый иммунитет онкологических больных (топ-10 за 2020 г.).

Под руководством А. И. Зинченко реконструирована бактериальная бесклеточная система трансляции для получения белковых продуктов, синтез которых традиционным способом, предусматривающим использование целых бактериальных клеток, затруднен или невозможен. С ее помощью синтезирован ряд хозяйственно ценных белков, в том числе субъединица бактериального токсина для создания вакцины против энтеритов крупного рогатого скота и растительный белок интенсивно-сладкого вкуса – браззеин. Этот белок характеризуется безвредностью и практически не имеет калорийности, что открывает перспективу создания сахарозаменителя нового поколения для нужд медицины и пищевой промышленности.

Научные труды А. И. Зинченко широко известны в республике и за рубежом. Он автор более 400 научных публикаций, 20 авторских свидетельств СССР на изобретения и 18 патентов Республики Беларусь. Индекс Хирша его публикаций составляет 11 (по базе данных Scopus).

А. И. Зинченко уделяет много внимания подготовке научных кадров высшей квалификации, руководит созданным в 2008 г. на базе Института микробиологии НАН Беларуси филиалом кафедры экологической химии и биохимии УО «Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ». Им разработаны программы спецкурсов «Биотехнология» и «Молекулярная биология вирусов и противовирусная терапия», которые он более 20 лет преподает студентам этого вуза. В 2005 г. А. И. Зинченко издан одобренный Министерством образования Республики Беларусь учебник по молекулярной биологии вирусов и антивирусной терапии для студентов высших учебных заведений, не потерявший своей актуальности до сих пор.

Под руководством А. И. Зинченко защищено 9 кандидатских и 3 магистерских диссертации, 40 дипломных работ.

С 2012 по 2018 г. А. И. Зинченко входил в состав экспертного совета ВАК Республики Беларусь по специальности «микробиология». С 1995 по 2012 г. и с 2018 г. по настоящее время он является членом совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при Институте микробиологии НАН Беларуси.

Результаты профессиональной деятельности А. И. Зинченко отмечены юбилейной медалью «В честь 80-летия НАН Беларуси» (2009 г.), памятными знаками «В честь основания НАН Беларуси» (2014 г.) и «В честь 90-летия НАН Беларуси» (2018 г.), почетными грамотами различных министерств и ведомств. В 2016 г. ему объявлена благодарность Белорусского государственного университета за многолетнюю плодотворную трудовую деятельность в связи с 95-летием со дня основания БГУ.

Говоря о А. И. Зинченко как об ученом и человеке, следует отметить его прекрасные организаторские способности, большую работоспособность, высокую эрудицию, оригинальность мышления, настойчивость в достижении поставленных целей, порядочность, отзывчивость и доброжелательность. Анатолий Иванович пользуется большим уважением среди коллег.

Отделение биологических наук НАН Беларуси и коллектив Института микробиологии НАН Беларуси сердечно поздравляют Анатолия Ивановича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья и новых научных достижений на благо белорусской науки.

*Отделение биологических наук НАН Беларуси,
коллектив Института микробиологии НАН Беларуси*