

# ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

---

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2022. Т. 67, № 3

---

# ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

---

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2022. Т. 67, № 3

---

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** – Центральный ботанический сад 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

Редакционный совет

- 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

*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, № 3.

*Выходит на русском, белорусском и английском языках*

---

Редактор *В. Г. Колосовская*  
Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 06.07.2022. Выход в свет 26.07.2022. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 74 экз. Заказ 127.  
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,66 руб., ведомственная подписка – 29,74 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. 3

---

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** – Central Botanical Garden 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  
**Vasiliy 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** – Warszaw 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  
**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. 3.

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

Editor *V. G. Kolosovskaya*  
Computer imposition *Yu. A. Aheichyk*

Sent for press 06.07.2022. Output 26.07.2022. Format 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Offset paper.  
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 74 copies. Order 127.  
Number price: individual subscription – 12.66 byn., departmental subscription – 29.74 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**

<b>Герасимович К. М., Рыбинская Е. И., Овчинников И. А., Неведь Е. Л., Калацкая Ж. Н., Гилевская К. С., Николайчук В. В., Ламан Н. А.</b> Влияние конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами и их наночастиц на рост проростков ячменя и содержание в них пролина при солевом стрессе.....	263
<b>Морозова А. Н., Охремчук А. Э., Головнева Н. А.</b> Молекулярно-генетический анализ детерминант, кодирующих $\beta$ -галактозидазы бактерий <i>Bifidobacterium longum</i> БИМ В-813 Д.....	274
<b>Наумович Н. И., Алещенкова З. М., Ананьева И. Н., Сафронова Г. В.</b> Культивирование солеустойчивых бактерий – основы микробного удобрения «Биотилия».....	285
<b>Груммо Д. Г., Пугачевский А. В., Русецкий С. Г., Зеленкевич Н. А.</b> Анализ динамики лесного растительного покрова Беларуси на основе данных дистанционного зондирования.....	293
<b>Кондратов Е. В., Торчик В. И., Кураксина А. А.</b> Особенности прививки декоративных форм рода <i>Larix</i> Mill. ....	304

### **АГЛЯДЫ**

<b>Волотовский И. Д., Пинчук С. В., Василевич И. Б.</b> Транскрипционные факторы – ключевые регуляторные биомолекулы, определяющие направление дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в соматические клетки органов и тканей .....	309
<b>Страх Я. Л., Игнатовец О. С.</b> Химический состав и биологическая активность метаболитов <i>Rubus chamaemorus</i> L.....	321
<b>Артюх Т. В.</b> Изучение синергии антибактериальных препаратов с использованием метода «шахматной доски» и анализа «времени уничтожения» .....	332

### **ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ**

<b>Николай Александрович Картель</b> (К 85-летию со дня рождения) .....	343
---	-----

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

## **CONTENTS**

<b>Herasimovich K. M., Rybinskaya K. I., Ovchinnikov I. A., Nedved H. L., Kalatskaja J. N., Hileuskaya K. S., Nikalaichuk V. V., Laman N. A.</b> Influence of chitosan and hydroxycinnamic acids conjugates and nanoparticles on the growth of barley seedlings and proline contents under saline stress .....	263
<b>Morozova A. N., Akhremchuk A. E., Golovnyova N. A.</b> Molecular-genetic analysis of determinants encoding $\beta$ -galactosidases of bacteria <i>Bifidobacterium longum</i> BIM B-813 D .....	274
<b>Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V.</b> Cultivation of halotolerant bacteria as a basis of the microbial fertilizer “Biotilia” .....	285
<b>Grummo Dz. G., Pugachevsky A. V., Rusetsky S. G., Zeliankevich N. A.</b> Analysis of forest cover dynamics in Belarus based on remote sensing data .....	293
<b>Kandratau Ya. V., Torchyk U. I., Kuraksina A. A.</b> Features of grafting decorative forms of the genus <i>Larix</i> Mill.....	304

## **REVIEWS**

<b>Volotovskii I. D., Pinchuk S. V., Vasilevich I. B.</b> Transcription factors – key regulatory biomolecules determining the differentiation of mesenchymal stem cells into the somatic cells of organs and tissues .....	309
<b>Strakh Ya. L., Ignatovets O. S.</b> Chemical composition and biological activity of metabolites of <i>Rubus chamaemorus</i> L. ...	321
<b>Artyukh T. V.</b> Studying synergy of antibacterial drugs using the “checkerboard” method and the “time-kill” analysis .....	332

## **SCIENTISTS OF BELARUS**

<b>Nikolay Aleksandrovich Kartel</b> (To the 85th Anniversary) .....	343
--	-----

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 581.19+577.114  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-263-273>

Поступила в редакцию 28.04.2022  
Received 28.04.2022

К. М. Герасимович<sup>1</sup>, Е. И. Рыбинская<sup>1</sup>, И. А. Овчинников<sup>1</sup>, Е. Л. Недведь<sup>1</sup>,  
Ж. Н. Калацкая<sup>1</sup>, К. С. Гилевская<sup>2</sup>, В. В. Николайчук<sup>2</sup>, Н. А. Ламан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

## ВЛИЯНИЕ КОНЬЮГАТОВ ХИТОЗАНА С ОКСИКОРИЧНЫМИ КИСЛОТАМИ И ИХ НАНОЧАСТИЦ НА РОСТ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ И СОДЕРЖАНИЕ В НИХ ПРОЛИНА ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

**Аннотация.** Проведена оценка влияния синтезированных материалов низко- и высокомолекулярного хитозана с оксикоричными кислотами (феруловой и кофейной) на процессы прорастания семян ячменя. Показано, что обработка семян конъюгатами и наночастицами не оказывает негативного влияния на ростовые показатели проростков ячменя, выращиваемых в благоприятных условиях, а обработка семян конъюгатом хитозана с молекулярной массой 30 кДа и кофейной кислоты способствует ускорению роста проростков, при этом в растительных тканях содержится минимальный уровень свободного пролина. При применении конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами и их наночастиц у проростков ячменя реализуются различные стратегии адаптации к солевому стрессу (24-часовое действие 4 %-ного NaCl). Наиболее эффективная адаптация отмечалась при обработке конъюгатами хитозана с молекулярной массой 30 кДа с оксикоричными кислотами.

**Ключевые слова:** хитозан, оксикоричные кислоты, феруловая кислота, кофейная кислота, конъюгаты, наночастицы, ячмень (*Hordeum vulgare* L.), солевой стресс, биометрические показатели, пролин

**Для цитирования:** Влияние конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами и их наночастиц на рост проростков ячменя и содержание в них пролина при солевом стрессе / К. М. Герасимович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 263–273. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-263-273>

Kanstantsin M. Herasimovich<sup>1</sup>, Katsiaryna I. Rybinskaya<sup>1</sup>, Igor A. Ovchinnikov<sup>1</sup>, Helen L. Nedved<sup>1</sup>,  
Joanna N. Kalatskaja<sup>1</sup>, Kseniya S. Hileuskaya<sup>2</sup>, Viktoria V. Nikalaichuk<sup>2</sup>, Nikolai A. Laman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

## INFLUENCE OF CHITOSAN AND HYDROXYCINNAMIC ACIDS CONJUGATES AND NANOPARTICLES ON THE GROWTH OF BARLEY SEEDLINGS AND PROLINE CONTENTS UNDER SALINE STRESS

**Abstract.** The effect of seed treatment with various materials of chitosan and hydroxycinnamic acids on the growth of barley seedlings was evaluated. It was shown that chitosan-hydroxycinnamic acid conjugates and nanoparticles had no negative effect on the initial stages of the growth of barley seedlings. Adaptation of seedlings after 24 h exposure to 4 % NaCl in the samples of conjugates of 30 kDa chitosan with caffeic and ferulic acids was more effective. There was a decrease in proline contents and restoration of the growth activity under post-stress conditions.

**Keywords:** chitosan, hydroxycinnamic acids, ferulic acid, caffeic acid, conjugates, nanoparticles, barley (*Hordeum vulgare* L.), saline stress, growth parameters, proline

**For citation:** Herasimovich K. M., Rybinskaya K. I., Ovchinnikov I. A., Nedved H. L., Kalatskaja J. N., Hileuskaya K. S., Nikalaichuk V. V., Laman N. A. Influence of chitosan and hydroxycinnamic acids conjugates and nanoparticles on the growth of barley seedlings and proline contents under saline stress. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seryya biyagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 263–273 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-263-273>

**Введение.** В последние годы биополимеры природного происхождения широко используются в различных отраслях биологии и медицины. Примером может служить хитозан, который активно применяется и в агрохимических целях, что обусловлено его биоразлагаемостью в почве, низкой токсичностью для живых организмов, доступностью сырья и наличием биологической активности. Хитозан является линейным аминополисахаридом, состоящим из различного количества

чередующихся звеньев 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы, соединенных β-(1→4) гликозидными связями. Наличие у хитозана реакционноспособной аминогруппы позволяет легко осуществлять его структурную модификацию различными методами с целью придания ему новых свойств. Введение новых функциональных групп и заместителей позволяет получать производные с повышенной растворимостью и антиоксидантной активностью [1].

Woranuch с соавт. [2] получили конъюгат хитозана (200 кДа) с феруловой кислотой и показали улучшение его растворимости и антиоксидантной активности. Liu с соавт. [3] получили карбоксиметилхитозан с ковалентно связанными оксикоричными кислотами (галловой, кофейной, феруловой) и изучили его антиоксидантную активность в отношении модельных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ), гидроксильного радикала и пероксида водорода, а также ингибирование перекисного окисления липидов новыми соединениями. Показано, что антиоксидантная активность изменялась в ряду соединений следующим образом: карбоксиметилхитозан с кислотой > карбоксиметилхитозан > хитозан [3]. Еом с соавт. [4] осуществлен синтез конъюгатов хитоолигосахаридов с молекулярной массой 3–5 кДа с различными фенольными кислотами (гидроксibenзойной, кумаровой, протокатехиновой, кофейной, ванильной, феруловой, сиреневой и синапиновой), а также исследована антиоксидантная активность в тестах с ДФПГ и гидроксильным радикалом. Наибольшую активность проявляли конъюгаты с кофейной и протокатехиновой кислотами, содержание полифенолов составляло 81 и 89 мг/г соответственно.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что химическая модификация хитозана с введением новых функциональных групп и заместителей позволяет получать производные с повышенной растворимостью и антиоксидантной активностью. Перспективным направлением исследований конъюгатов хитозана и полифенольных соединений является оценка *in vivo* активности новых соединений.

Ранее нами было изучено [5] влияние обработки семян конъюгатами хитозана молекулярной массой 30 кДа с кофейной и феруловой кислотами на ростовые параметры и ряд биохимических показателей у проростков огурца (*Cucumis sativus* L.). Показаны значительный ростстимулирующий эффект при обработке семян конъюгатами в оптимальных условиях выращивания, а также снижение интенсивности окислительных процессов, стабилизация уровня пролина, повышение пероксидазной активности в семядольных листьях проростков огурца при действии длительного натрий-хлоридного засоления. Кроме того, оценена ростовая активность наночастиц хитозана с молекулярными массами 20 и 800 кДа и феруловой кислотой на растениях пшеницы и редиса [6]. Наночастицы на основе хитозана (20 кДа) и феруловой кислоты стимулировали всхожесть семян озимой пшеницы, но при этом снижали всхожесть семян редиса, что свидетельствует о разной направленности действия на однодольные и двудольные растения.

Целью данной работы являлось изучение влияния конъюгатов хитозана с различной молекулярной массой и оксикоричных кислот и их наночастиц на рост проростков ячменя, а также их активности в качестве индукторов устойчивости проростков ячменя к солевому стрессу.

**Объекты и методы исследования.** Исследования проводили на растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Дивосны. Семена обрабатывали путем механического перемешивания в растворах конъюгатов или наночастиц хитозана с оксикоричными кислотами в объеме 400 мкл на 20 г семян до равномерного распределения раствора по поверхности. Затем семена выдерживали при комнатной температуре в течение 24 ч. Контролем служили необработанные семена. Перед закладкой опыта семена имели одинаковую исходную влажность. Растения выращивали рулонным способом до 10-дневного возраста в условиях искусственного освещения с интенсивностью 4 тыс. лк, фотопериод: 14 ч – свет, 10 ч – темнота. Для создания солевого стресса рулоны с 5-дневными проростками помещали в 4 %-ный раствор хлорида натрия на 24 ч, а затем переносили на воду. В благоприятных условиях (отсутствие стресса) растения весь период выращивали на дистиллированной воде. Биометрические параметры оценивали на 6-е сутки (стрессовые условия) и на 10-е сутки (постстрессовый период).

Содержание пролина в листьях и корнях определяли согласно методу, изложенному в работе [7]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Jasko V-630 (Япония) при длине волны 515 нм.

Для синтеза коньюгатов использовали хитозаны с молекулярной массой 30 кДа (степень деацетилирования 98,3 %, Glentham Life Sciences, Великобритания) и 250 кДа (степень деацетилирования  $\geq 90,0$  %, Glentham Life Sciences, Великобритания), ФК ( $M = 194,18$  г/моль) и КК ( $M = 180,16$  г/моль) (Sigma-Aldrich, США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (EDC, Sigma-Aldrich). Коньюгаты хитозана с оксикоричными кислотами (Х30-ФК, Х30-КК и Х250-ФК, Х250-КК) получали карбодиимидным методом с предварительной активацией карбоксильных групп кислоты согласно методике, описанной в работе [6].

Наночастицы на основе коньюгатов хитозана с оксикоричными кислотами получали методом ионотропного гелеобразования, как описано в работе [8]. Для этого использовали предварительно синтезированные карбодиимидным методом, как описано выше, коньюгаты низкомолекулярного (30 кДа) и высокомолекулярного (800 кДа, степень деацетилирования 75,4 %, Glentham Life Sciences, Великобритания) хитозана с феруловой кислотой (Х30-ФК и Х800-ФК соответственно). В качестве сшивающих агентов применяли безводный сульфат натрия (ЗАО «Пять океанов», Беларусь) и глутаральдегид (50 %-ный водный раствор, AppliChem, Германия).

Статистическую обработку результатов осуществляли с применением общепринятых методик [9]. На диаграммах приведены средние значения показателей с указанием стандартной ошибки средней, надстрочные символы обозначают достоверность различий средних значений по критерию Стьюдента при  $p \leq 0,05$ : *a* – различия достоверны относительно бесстрессового контроля, *b* – различия достоверны относительно стрессового контроля.

**Результаты и их обсуждение.** Обработка семян коньюгатами не оказывала ингибирующего действия на прорастание ячменя, что выражалось в отсутствии существенных различий по ростовым параметрам относительно контрольных проростков, выращенных в оптимальных условиях. Отмечено увеличение до 10 % длины корней у 10-дневных проростков при обработке Х30-КК (рис. 1, *b*) и сухой массы побега у 6-дневных проростков в варианте Х250-ФК (рис. 2, *c*).

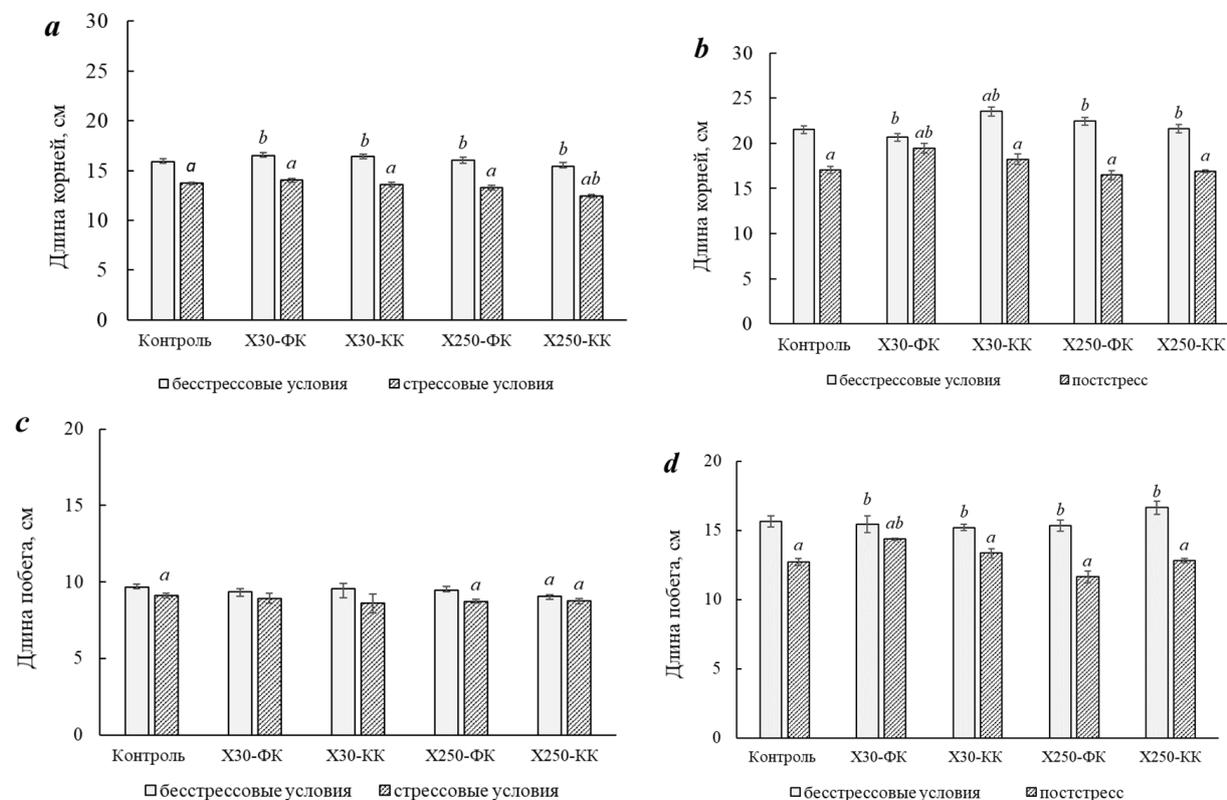


Рис. 1. Длина корней и побега у 6-дневных (*a, c*) и 10-дневных (*b, d*) проростков ячменя при обработке семян коньюгатами хитозана и оксикоричных кислот

Fig. 1. Length of roots and shoot in 6- (*a, c*) and 10-day-old (*b, d*) barley seedlings at seed treatment with conjugates of chitosan and hydroxycinnamic acids

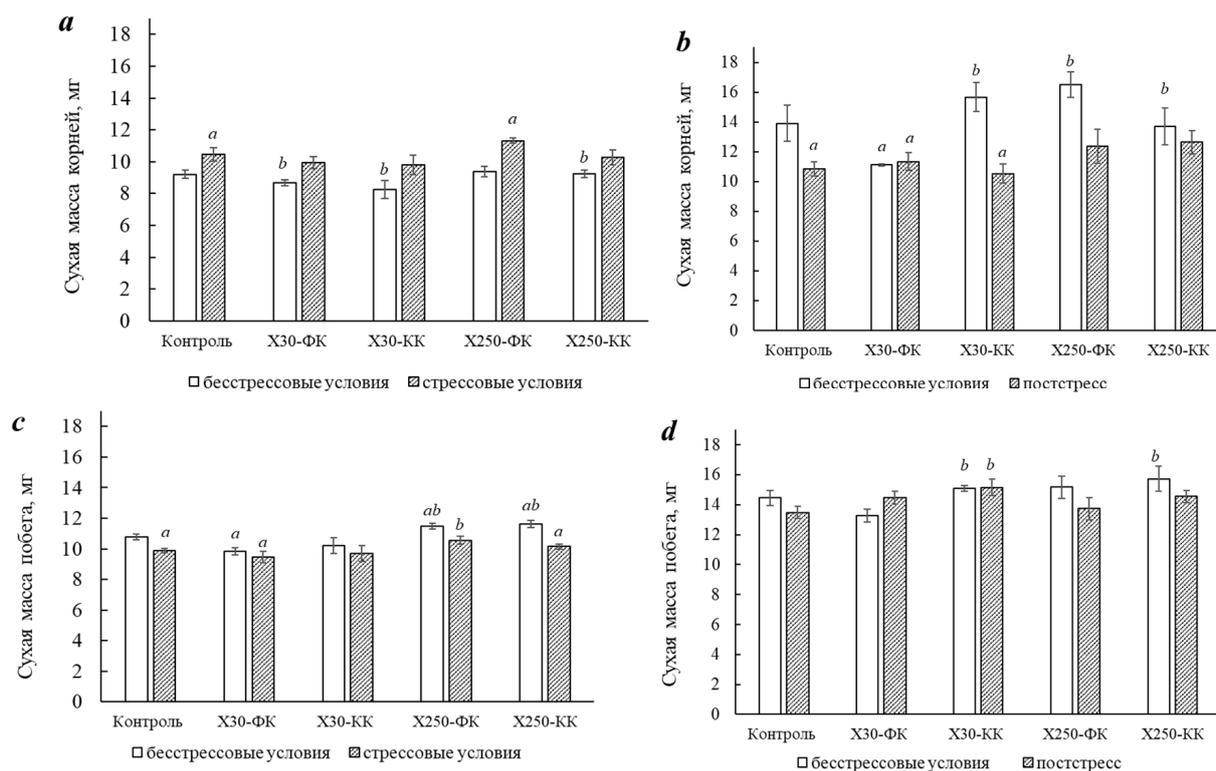


Рис. 2. Сухая масса корней и побега у 6-дневных (a, c) и 10-дневных (b, d) проростков ячменя при обработке семян конъюгатами хитозана и оксикоричных кислот

Fig. 2. Dry weight of roots and shoot in 6- (a, c) and 10-day-old (b, d) barley seedlings at seed treatment with conjugates of chitosan and hydroxycinnamic acids

Действие 4 %-ного раствора NaCl в течение 24 ч вызвало торможение процессов роста, при этом не было существенных различий между исследуемыми вариантами конъюгатов. В постстрессовый период при обработке X30-ФК длина корней возрастала на 14 %, длина побега – на 13 % относительно постстрессового контроля (см. рис. 1, b, d). Сухая масса побега увеличивалась на 12 % в варианте X30-КК относительно контроля и достигала уровня 10-дневных растений, выращиваемых без стрессового фактора при соответствующей обработке (рис. 2, d). Сходную картину наблюдали и в варианте X30-ФК, в этом случае масса побега достоверно превышала данный показатель на 9 % у обработанных X30-ФК растений без действия хлорида натрия (рис. 2, d).

В благоприятных условиях прорастания семян, обработанных конъюгатами X30-ФК и X30-КК, содержание пролина в корнях проростков было ниже, чем в контроле: на 47 и 32 % через 6 сут, на 56 и 47 % через 10 сут соответственно. При обработке семян X30-КК и их прорастании в благоприятных условиях уровень пролина в побегах проростков также был меньше по сравнению с контролем (в среднем на 30 %). При использовании для обработки семян конъюгатов с большей молекулярной массой хитозана (250 кДа) содержание пролина в проростках в целом существенно не отличалось от его уровня у контрольных проростков. Поскольку корни находились непосредственно в солевом растворе, они проявляли большую чувствительность к воздействию 4 %-ного NaCl, что выражалось в повышенном уровне пролина в них по сравнению с побегами. Наблюдалось существенное возрастание содержания пролина в корнях при действии 4 %-ного NaCl по сравнению с проростками, выращиваемыми без стресса (рис. 3, a). Максимальное накопление пролина обнаружено в варианте X30-КК – его уровень в корнях был в 5,5 раза, а в побегах в 3 раза выше, чем в проростках соответствующего варианта в благоприятных условиях. При этом по сравнению со стрессовым контролем самый высокий уровень пролина (на 53 % выше) отмечен при обработке X30-КК, тогда как между остальными вариантами и стрессовым контролем существенных различий не выявлено (рис. 3, a, c).

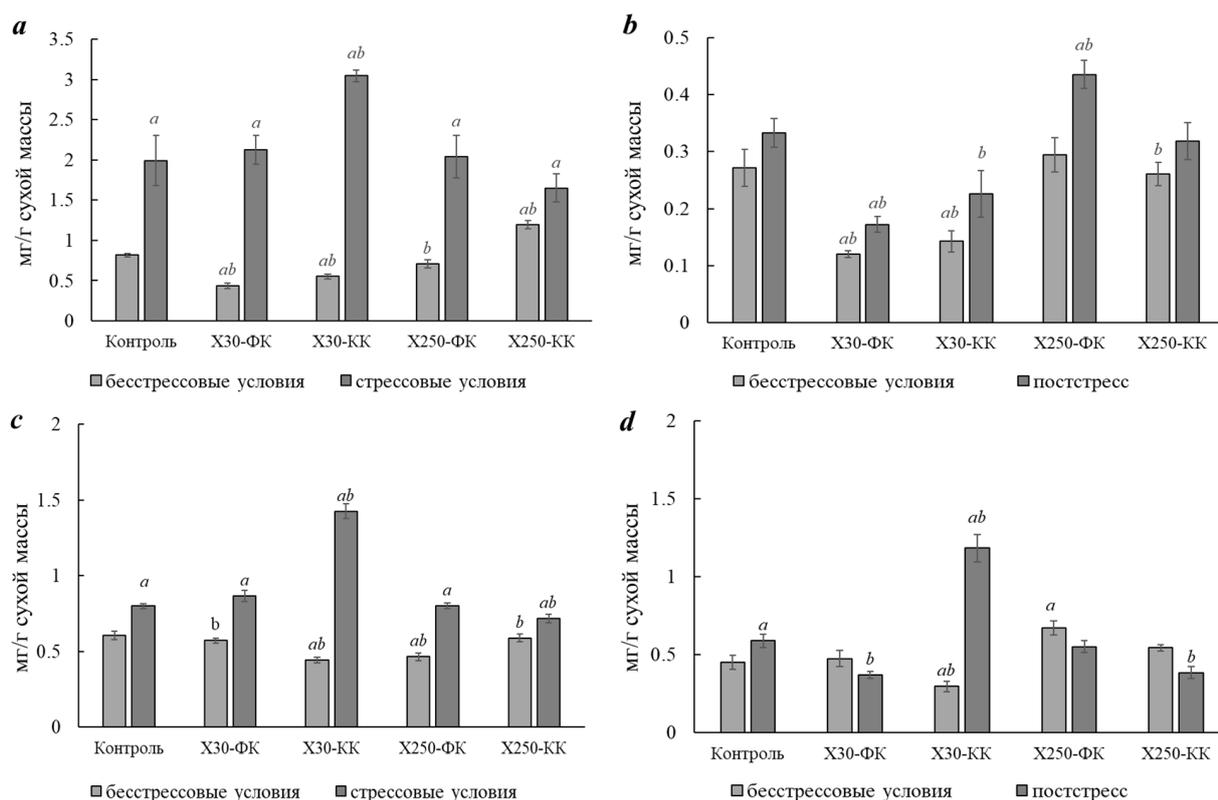


Рис. 3. Содержание пролина в корнях и листьях 6-дневных (a, c) и 10-дневных (b, d) проростков ячменя при обработке семян конъюгатами хитозана и оксикоричных кислот

Fig. 3. Proline contents in the roots and leaves of 6- (a, c) and 10-day-old (b, d) barley seedlings at seed treatment with conjugates of chitosan and hydroxycinnamic acids

В постстрессовый период наблюдали значительное снижение уровня пролина в корнях 10-дневных проростков. При этом его снижение (в среднем на 40 %) относительно постстрессового контроля регистрировали для вариантов с применением конъюгатов на основе хитозана с молекулярной массой 30 кДа, а в побегах – только в варианте X30-ФК. Содержание пролина в побегах при их обработке X30-КК оставалось таким же высоким, как и в условиях стресса. При применении конъюгата X250-ФК отмечено увеличение содержания пролина в корнях относительно постстрессового контроля (рис. 3, b).

Таким образом, в зависимости от вида оксикоричной кислоты конъюгаты проявляют разнонаправленное действие. В благоприятных условиях выращивания при обработке семян конъюгатами хитозана с молекулярной массой 30 кДа и оксикоричных кислот отмечено низкое содержание пролина в корнях, а при обработке X30-КК – и в побегах проростков. Обработка семян X30-КК в большей степени способствовала ускорению роста проростков, при этом в тканях зафиксирован минимальный уровень свободного пролина в сравнении с контролем. Можно предположить, что синтезируемые аминокислоты максимально используются в основном метаболизме для поддержания активного роста проростков. В стрессовых условиях выращивания у проростков из обработанных конъюгатами семян реализуются различные стратегии адаптации. Содержание пролина значительно увеличивается в варианте X30-КК и остается высоким в постстрессовый период, при этом не наблюдается различий в скорости роста растений в сравнении с контролем. При обработке X30-ФК обнаружено ускорение роста проростков в постстрессовый период на фоне снижения содержания пролина в растительных тканях по сравнению с контролем.

Обработка семян ячменя исследуемыми образцами наночастиц на основе хитозана с молекулярной массой 30 и 800 кДа и феруловой кислоты также не оказывала ингибирующего действия на проростки. У 6- и 10-дневных проростков не наблюдалось каких-либо существенных изменений по биометрическим показателям (длина корней и побега) относительно контроля (рис. 4).

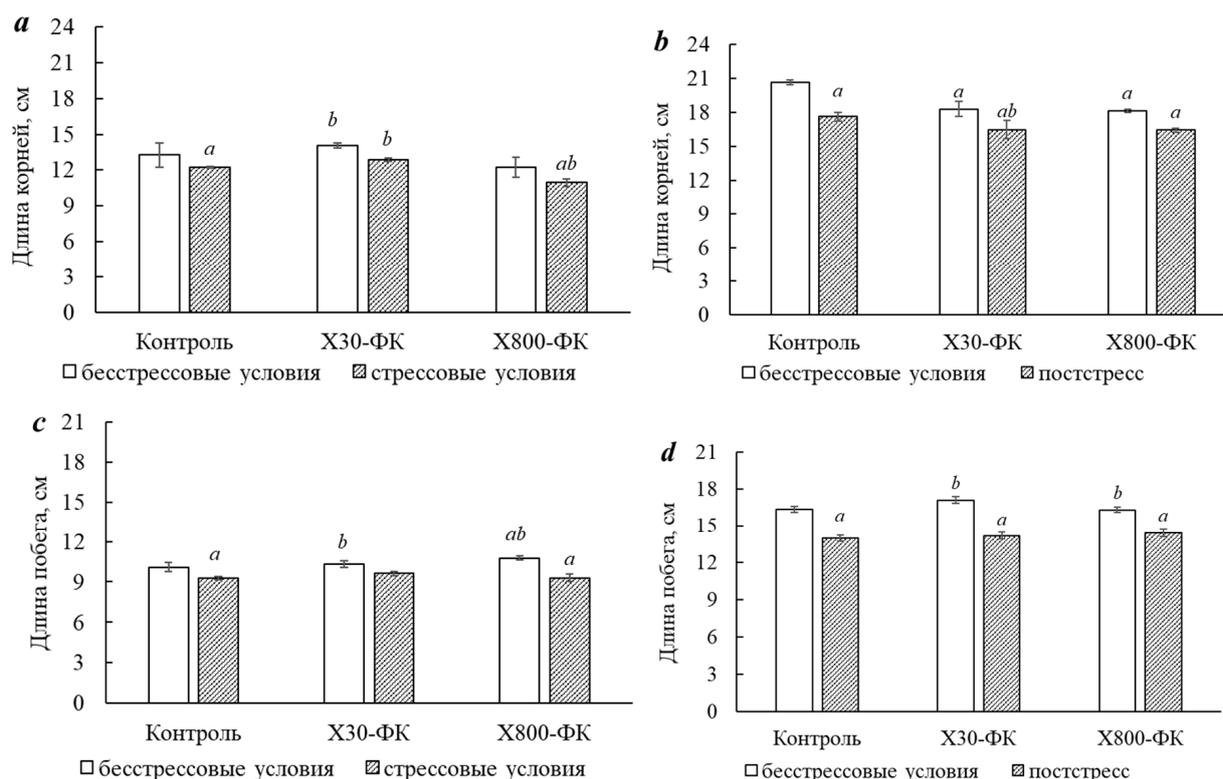


Рис. 4. Длина корней и побега у 6-дневных (a, c) и 10-дневных (b, d) проростков ячменя при обработке семян наночастицами хитозана и оксикоричных кислот

Fig. 4. Length of roots and shoot in 6- (a, c) and 10-day-old (b, d) barley seedlings at seed treatment with nanoparticles of chitosan and hydroxycinnamic acids

Выявлено возрастание сухой массы побега: на 11 и 17 % относительно контроля в вариантах Х30-ФК и Х800-ФК соответственно у 6-дневных проростков, выращенных в благоприятных условиях (рис. 5, c), на 15 % относительно постстрессового контроля при обработке Х800-ФК, NaCl у 10-дневных проростков (рис. 5, d).

В благоприятных условиях при обработке семян наночастицами Х30-ФК у 6-дневных побегов обнаружено увеличение содержания пролина (на 37 % по сравнению с контролем), однако к 10-м суткам во всех вариантах уровень пролина был практически одинаковым, в корнях различий также не наблюдалось (рис. 6).

В условиях солевого стресса содержание пролина в корнях при обработке наночастицами Х30-ФК было на 34 % ниже, чем в контроле, и достоверно не отличалось от контрольного значения в постстрессовый период (рис. 6, a, b). В варианте Х800-ФК уровень пролина в корнях в постстрессовый период снизился на 59 % относительно контроля, а в побегах в условиях стресса его содержание возросло на 20 % по сравнению с контрольными проростками и оставалось высоким и в постстрессовый период (рис. 6, b, c, d).

Сравнительный анализ исследуемых конъюгатов и наночастиц хитозана с различной молекулярной массой и оксикоричных кислот показал отсутствие у них ингибирующего действия в отношении прорастающих семян ячменя, наибольший ростстимулирующий эффект на проростки в оптимальных условиях проявлялся в случае применения конъюгатов хитозана с молекулярной массой 30 кДа.

Одним из существенных негативных эффектов засоления является ингибирование роста растений, вызванное водным дефицитом, что сопровождается нарушением клеточного гомеостаза и снижением продуктивности растений [10]. Анализ литературных данных показал, что обработка семян растений хитозаном в различных концентрациях приводит к повышению их всхожести, возрастанию длины и массы корней и побегов в условиях засухи, низкотемпературного

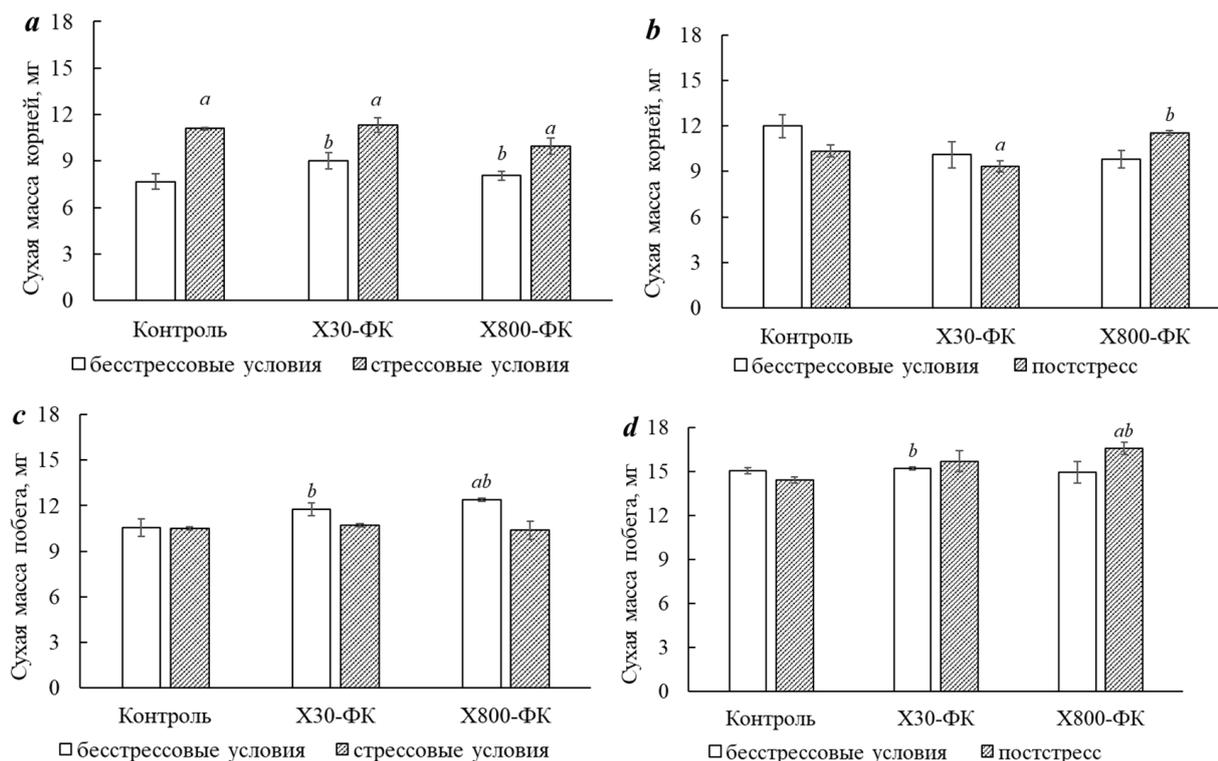


Рис. 5. Сухая масса корней и побега у 6-дневных (a, c) и 10-дневных (b, d) проростков ячменя при обработке семян наночастицами хитозана и оксикоричных кислот

Fig. 5. Dry weight of roots and shoot in 6- (a, c) and 10-day-old (b, d) barley seedlings at seed treatment with nanoparticles of chitosan and hydroxycinnamic acids

и солевого стрессов [11–13]. Так, обработка семян растений *Carum copticum* L. хитозаном в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,5 % приводила к возрастанию их всхожести при действии солевого стресса, а также к увеличению длины корней, длины и сухой массы побегов относительно стрессового контроля [14]. Экзогенное применение хитозанов с различной молекулярной массой на растениях твердой пшеницы *Triticum durum* Desf. значительно снижало негативное действие 200 мМ NaCl, что выражалось в повышении ростовых показателей относительно стрессовых растений, при этом наибольший эффект проявлялся при опрыскивании листьев хитозанами с молекулярной массой 50–190 и 190–310 кДа [15].

Аккумуляция пролина является типичной реакцией растений на солевой стресс, однако она зависит от вида растений, стадии их развития и интенсивности солевого стресса [16]. Обработка семян хитозаном значительно повышала уровень пролина в растениях риса, пшеницы и томатов [17–19]. Обработка низкомолекулярным хитозаном приводила к накоплению пролина и снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов в растениях подсолнечника *Carthamus tintorius* L. в условиях солевого стресса [20]. В проростках кукурузы *Zea mize* L. и пшеницы *Triticum aestivum* L. при их обработке низкими концентрациями хитозана возрастала активность антиоксидантных ферментов и содержание пролина, тогда как при их обработке высокими концентрациями хитозана отмечалось снижение накопления пролина в условиях солевого стресса [21].

У проростков из обработанных конъюгатами семян в стрессовых условиях выращивания, вероятно, реализуются различные стратегии адаптации. Содержание пролина значительно увеличивается в варианте X30-КК и остается высоким в постстрессовый период, при этом не наблюдается различий в скорости роста растений в сравнении с контролем. При обработке X30-ФК обнаружено ускорение роста и развития проростков в постстрессовый период на фоне снижения содержания пролина в растительных тканях по сравнению с контролем.

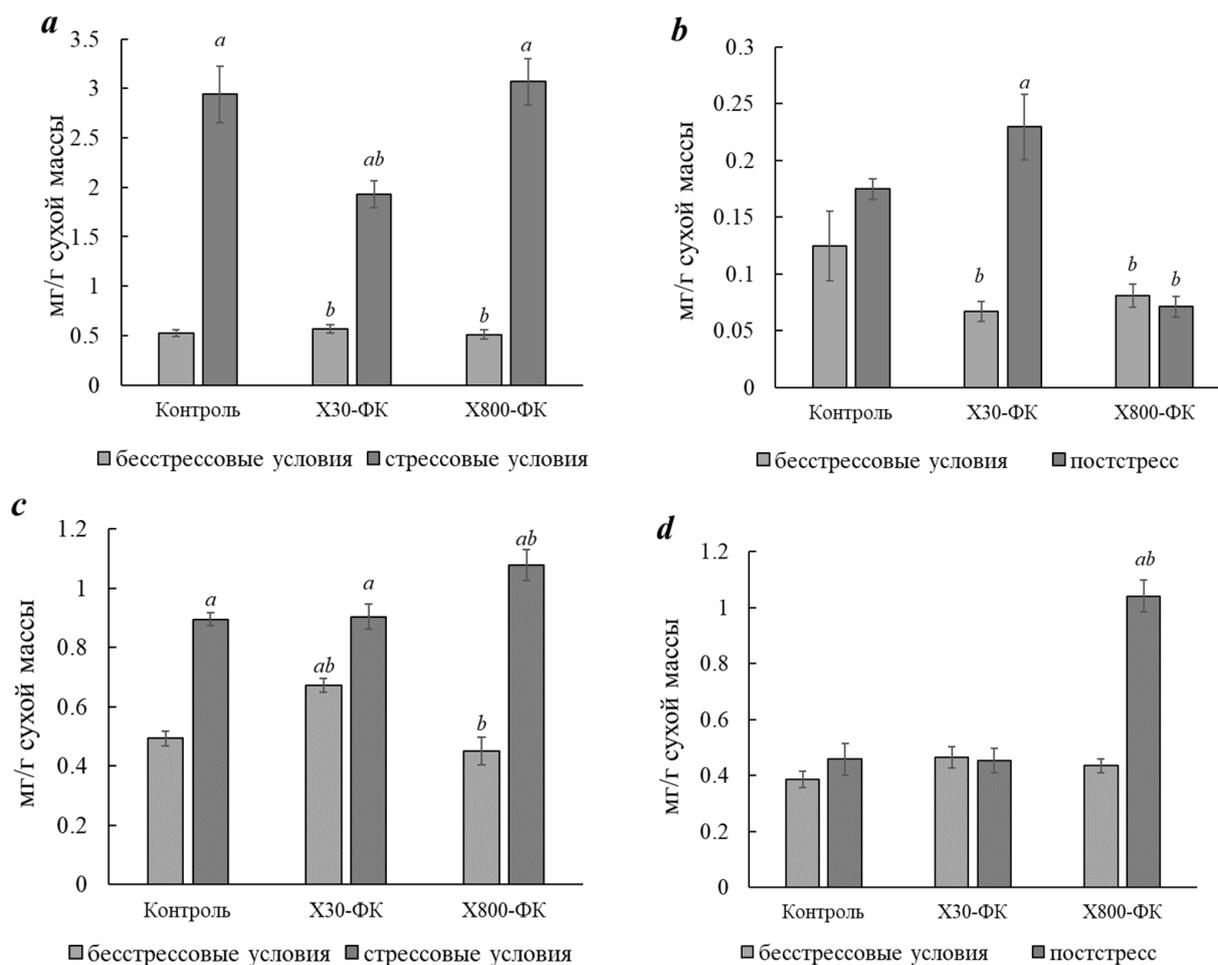


Рис. 6. Содержание пролина в корнях и листьях 6-дневных (a, c) и 10-дневных (b, d) проростков ячменя при обработке семян наночастицами хитозана и оксикоричных кислот

Fig. 6. Proline contents in the roots and leaves of 6- (a, c) and 10-day-old (b, d) barley seedlings at seed treatment with nanoparticles of chitosan and hydroxycinnamic acids

Показана неоднозначная динамика изменения содержания пролина в корнях и листьях проростков при обработке наночастицами при кратковременном действии NaCl и в постстрессовых условиях. При этом не наблюдалось различий по ростовым параметрам между проростками с применением наночастиц и контрольными растениями.

Таким образом, эффективность обработки семян конъюгатами хитозана с молекулярной массой 30 кДа и оксикоричных кислот заключалась в смягчении действия сильного и кратковременного солевого стресса, о чем свидетельствуют активный рост проростков в постстрессовый период, а также снижение стресс-индуцируемого накопления пролина относительно контрольных проростков, подвергшихся стрессовому воздействию.

**Заключение.** Проведенные исследования показали, что конъюгаты и наночастицы низко- и высокомолекулярного хитозана и феруловой или кофейной кислот не проявляют токсичного действия в отношении прорастающих семян ячменя. Обработка семян конъюгатами X30-КК вызывает ускорение роста проростков в благоприятных условиях прорастания, при этом в тканях содержится минимальный уровень свободного пролина в сравнении с контролем. В стрессовых условиях выращивания (24-часовое действие 4 %-ного хлорида натрия) у проростков из обработанных конъюгатами и наночастицами семян реализуются различные стратегии адаптации. Наиболее эффективная адаптация отмечается при обработке конъюгатами хитозана с молекулярной массой 30 кДа с оксикоричными кислотами. Содержание пролина значительно увеличивается в варианте X30-КК и остается высоким в постстрессовый период, при этом не наблюдается

различий в скорости роста растений в сравнении с контролем. При обработке конъюгатом Х30-ФК обнаружено ускорение роста проростков в постстрессовый период на фоне снижения содержания пролина в растительных тканях по сравнению с контролем. Эффективность обработки семян конъюгатами хитозанов с оксикоричными кислотами заключается в смягчении негативного действия сильного и кратковременного солевого стресса на развивающиеся проростки.

### Список использованных источников

1. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты / В. П. Варламов [и др.] // Успехи биол. химии. – 2020. – Т. 60. – С. 317–368.
2. Woranuch, S. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan / S. Woranuch, R. Yoksan // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – Vol. 96, N 2. – P. 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.006>
3. Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan / J. Liu [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.040>
4. Eom, T.-K. Synthesis of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity / T.-K. Eom, M. Senevirathne, S.-K. Kim // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 34, N 2. – P. 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.004>
5. Параметры роста и антиоксидантная активность в проростках огурца при применении конъюгатов хитозана с оксикоричными кислотами в условиях солевого стресса / Е. Л. Недведь [и др.] // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2022. – Т. 58, № 1. – С. 74–82.
6. Synthesis and properties of hydrogel particles based on chitosan-ferulic acid conjugates / A. Kraskouski [et al.] // *Soft Materials*. – 2021. – Vol. 19, N 4. – P. 495–502. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2021.187772>
7. Модифицированная методика определения пролина в растительных объектах / Г. Н. Шихалева [и др.] // *Вестн. Харьков. нац. ун-та им. В. Н. Каразина. Сер. Биология*. – 2014. – Т. 21, № 1112. – С. 168–172.
8. Preparation and properties of hydrogel microparticles based on chitosan / A. Kraskouski [et al.] // *Theor. Exp. Chem.* – 2020. – Vol. 56, N 4. – P. 243–252. <https://doi.org/10.1007/s11237-020-09655-1>
9. Grantz, S. A. *Primer of Biostatistics* / ed. S. Grantz. – 7th ed. – New York : McGraw-Hill, 2011. – 320 p.
10. Water stress in plants: Causes, effects and responses / S. Y. S. Lisar [et al.] // *Water Stress*. – 2012. – Vol. 1. – P. 1–14. <https://doi.org/10.5772/39363>
11. Zeng, D. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance / D. Zeng, X. Luo // *Open J. Soil Sci.* – 2012. – Vol. 2, N 3. – P. 282–288. <https://doi.org/10.4236/ojss.2012.23034>
12. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress / Y.-J. Guan [et al.] // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2009. – Vol. 10, N 6. – P. 427–433. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
13. Effect of seed treatment with chitosan on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings cv. inca lp-5 in saline medium / L. Martínez-González [et al.] // *Cultivos Tropicales*. – 2015. – Vol. 36, N 1. – P. 136–142.
14. Mahdavi, B. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress / B. Mahdavi, A. Rahimi // *Eurasia J. Biosci.* – 2013. – Vol. 7. – P. 69–76. <https://doi.org/10.5772/39363>
15. Chitan-induced activation of the antioxidant defense system counteracts the adverse effects of salinity in durum wheat / F. Qutitadamo [et al.] // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – Art. 1365. <https://doi.org/10.3390/plants10071365>
16. Mansour, M. M. F. Evaluation of proline functions in saline conditions / M. M. F. Mansour, E. F. Ali // *Photochemistry*. – 2017. – Vol. 140. – P. 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
17. Kong-Ngem, K. Proline, hydrogen peroxide, membrane stability and antioxidant enzyme activity as potential indicators for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) / K. Kong-Ngem, S. Bunnag, P. Theerakulpisut // *Int. J. Bot.* – 2012. – Vol. 8, N 2. – P. 54–65. <https://doi.org/10.3923/ijb.2012.54.65>
18. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress / L. Ma [et al.] // *Protoplasma*. – 2012. – Vol. 249, N 2. – P. 393–399. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0290-5>
19. LiQiang, G. Effects of chitosan on physiological characteristics of tomato seedlings under salt stress / G. LiQiang // *Agricult. Sci. Technol.-Hunan*. – 2012. – Vol. 13, N 3. – P. 551–553.
20. Chitosan improves osmotic potential tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings / B. S. Mahdavi [et al.] // *J. Crop Improv.* – 2011. – Vol. 25, N 6. – P. 728–741. <https://doi.org/10.1080/15427528.2011.606354>
21. Shams Peykani, L. Effect of chitosan on antioxidant enzyme activity, proline, and malondialdehyde content in *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. under salt stress condition / L. Shams Peykani, M. Farzami Sepehr // *Iran. J. Plant Physiol.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 2661–2670.

### References

1. Varlamov V. P., Il'ina A. V., Shagdarova B. Ts, Lun'kov A. P., Mysyakina I. S. Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental and applied aspects. *Uspekhi biologicheskoi khimii* [Advances in biological chemistry], 2020, vol. 60, pp. 317–368 (in Russian).
2. Woranuch S., Yoksan R. Preparation, characterization and antioxidant property of water-soluble ferulic acid grafted chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 2013, vol. 96, no. 2, pp. 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.006>

3. Liu J., Lu J.-F., Kan J., Tang Y. Q., Jin C.-H. Preparation, characterization and antioxidant activity of phenolic acids grafted carboxymethyl chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, vol. 62, pp. 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.040>
4. Eom T.-K., Senevirathne M., Kim S.-K. Synthesis of phenolic acid conjugated chitoooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, vol. 34, no. 2, pp. 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.004>
5. Nedved' E. L., Kalatskaya Zh. N., Ovchinnikov I. A., Rybinskaya E. I., Kraskovskii A. N., Nikolaichuk V. V., Gilevskaya K. S., Kulikovskaya V. I., Agabekov V. E., Laman N. A. Growth parameters and antioxidant activity in cucumber seedlings with application of chitosan and hydroxycinnamic acids conjugates under salt stress. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 2022, vol. 58, no. 1, pp. 74–82 (in Russian).
6. Kraskouski A. N., Nikolaichuk V. V., Kulikovskaya V. I., Hileuskaya K. S., Kalatskaja J. N., Nedved H. L., Laman N. A., Agabekov V. E. Synthesis and properties of hydrogel particles based on chitosan-ferulic acid conjugates. *Soft Materials*, 2021, vol. 19, no. 4, pp. 495–502. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2021.1877726>
7. Shikhaleeva G. N., Budnyak A. K., Shikhaleev I. I., Ivashchenko O. L. Modified method for the determination of proline in plant objects. *Visnik Kharkivs'kogo natsional'nogo universitetu imeni V. N. Karazina. Seriya "Biologiya" = The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 2014, vol. 21, no. 1112, pp. 168–172 (in Russian).
8. Kraskouski A. N., Nikolaichuk V. V., Kulikovskaya V. I., Hileuskaya K. S., Kalatskaja J. N., Nedved E. L., Laman N. A., Agabekov V. E. Preparation and properties of hydrogel microparticles based on chitosan. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 243–252. <https://doi.org/10.1007/s11237-020-09655-1>
9. Grantz S. A. *Primer of biostatistics. 7th ed.* New York, McGraw-Hill, 2011. 320 p.
10. Lisar S. Y. S., Motafakkerzad R., Hossain M. M., Rahman I. M. M. Water stress in plants: Causes, effects and responses. *Water Stress*, 2012, vol. 1, pp. 1–14. <https://doi.org/10.5772/39363>
11. Zeng D., Luo X. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. *Open Journal of Soil Science*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 282–288. <https://doi.org/10.4236/ojss.2012.23034>
12. Guan Y.-J., Hu J., Wang X.-J., Shao C.-X. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2009, vol. 10, no. 6, pp. 427–433. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
13. Martínez-González L., Yanelis R. G., Alejandro F. R., Miriam N. V. Effect of seed treatment with chitosan on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings cv. inca lp-5 in saline medium. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 1, pp. 136–142.
14. Mahdavi B., Rahimi A. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian Journal of Biosciences*, 2013, vol. 7, pp. 69–76 <https://doi.org/10.5772/39363>
15. Qutitadamo F., de Simone V., Beleggia R., Trono D. Chitan-induced activation of the antioxidant defense system counteracts the adverse effects of salinity in durum wheat. *Plants*, 2021, vol. 10, art. 1365 <https://doi.org/10.3390/plants10071365>
16. Mansour M. M. F., Ali E. F. Evaluation of proline functions in saline conditions. *Photochemistry*, 2017, vol. 140, pp. 52–68 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
17. Kong-Ngem K., Bunnag S., Theerakulpisut P. Proline, hydrogen peroxide, membrane stability and antioxidant enzyme activity as potential indicators for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Botany*, 2012, vol. 8, no. 2, pp. 54–65. <https://doi.org/10.3923/ijb.2012.54.65>
18. Ma L., Li Y., Yu C., Wang Y., Li X., Li N., Chen Q., Bu N. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. *Protoplasma*, 2012, vol. 249, no. 2, pp. 393–399. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0290-5>
19. LiQiang, G. Effects of chitosan on physiological characteristics of tomato seedlings under salt stress. *Agricultural Science and Technology-Hunan*, 2012, vol. 13, no. 3, pp. 551–553.
20. Mahdavi B. S. A., Modarres Sanavy M., Aghaalikhani M., Sharifi M. Chitosan improves osmotic potential tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings. *Journal of Crop Improvement*, 2011, vol. 25, no. 6, pp. 728–741. <https://doi.org/10.1080/15427528.2011.606354>
21. Shams Peykani L., Farzami Sepehr M. Effect of chitosan on antioxidant enzyme activity, proline, and malondialdehyde content in *Triticum aestivum* L. and *Zea maize* L. under salt stress condition. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 2661–2670.

### Информация об авторах

Герасимович Константин Михайлович – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: herasimovichkm@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1255-2545>

Рыбинская Екатерина Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kate.rybinskaya@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1677-2836>

### Information about the authors

Kanstantsin M. Herasimovich – Junior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: herasimovichkm@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1255-2545>

Katsiaryna I. Rybinskaya – Junior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kate.rybinskaya@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1677-2836>

*Овчинников Игорь Алексеевич* – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: igor-1606@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8662-3908>

*Недведь Елена Леонардовна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nedved\_e@tut.by. <https://orcid.org/0000-0002-9973-6549>

*Калацкая Жанна Николаевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kalatskayaj@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6395-0757>

*Гилевская Ксения Сергеевна* – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: k\_hilevskay@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-3121-0014>

*Николайчук Виктория Викторовна* – мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vical0bcn@gmail.com

*Ламан Николай Афанасьевич* – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 2200072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: laman.nikolai@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1067-4936>

*Igor A. Ovchinnikov* – Junior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: igor-1606@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-8662-3908>

*Helen L. Nedved* – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nedved\_e@tut.by. <https://orcid.org/0000-0002-9973-6549>

*Joanna N. Kalatskaja* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kalatskayaj@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6395-0757>

*Kseniya S. Hileuskaya* – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k\_hilevskay@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-3121-0014>

*Viktoria V. Nikalaichuk* – Junior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoryna Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vical0bcn@gmail.com

*Nikolai A. Laman* – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 2200072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: laman.nikolai@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-1067-4936>

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.222.2:579.252.2:576.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-274-284>

Поступила в редакцию 04.04.2022

Received 04.04.2022

**А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ, КОДИРУЮЩИХ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ БАКТЕРИЙ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* БИМ В-813 Д

**Аннотация.** Проведен молекулярно-генетический анализ генома бактерий *B. longum* БИМ В-813Д, отличающихся высоким уровнем продукции  $\beta$ -галактозидазы. В геноме *B. longum* БИМ В-813Д выявлены гены *Bgal\_small\_N*, *lacZ1*, *bgaB1*, *bgaB2*, *bgaB3* и *lacZ2*, кодирующие синтез  $\beta$ -галактозидаз. Предполагается, что *lacZ1*, *bgaB2* и *bgaB3*, характеризующиеся высокой степенью идентичности с генами близкородственных видов бифидобактерий, кодируют ферменты, которые осуществляют специфические реакции гидролиза и трансгликозилирования углеводов. Установлено, что ферменты BgaB1, BgaB2 и BgaB3 относятся к семейству GH42 гликозил-гидролаз, а LacZ1 и LacZ2 – к семейству GH2. Детально рассмотрены области генома, кодирующие синтез  $\beta$ -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813 Д. Сравнительный анализ локуса *lacZ1* *B. longum* БИМ В-813 Д и сходной области генома AS143\_01230 *B. longum* subsp. *longum* MC-42 показал наличие у *B. longum* БИМ В-813 гена транспозазы ISL3. Предполагается, что наличие инсерционной последовательности ISL3 в области *lacZ1* приводит к изменению экспрессии гена и увеличению продукции  $\beta$ -галактозидазы у *B. longum* БИМ В-813Д.

**Ключевые слова:** бифидобактерии, гликозил-гидролазы, *Bifidobacterium longum*,  $\beta$ -галактозидаза, гидролиз лактозы, трансгликозилирование

**Для цитирования:** Морозова, А. Н. Молекулярно-генетический анализ детерминант, кодирующих  $\beta$ -галактозидазы бактерий *Bifidobacterium longum* БИМ В-813 Д / А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 274–284. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-274-284>

**Antonina N. Morozova, Artur E. Akhremchuk, Natalia A. Golovnyova**

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

## MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF DETERMINANTS ENCODING $\beta$ -GALACTOSIDASES OF BACTERIA *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* BIM B-813 D

**Abstract.** The molecular-genetic analysis of the bacterial genome of the strain *B. longum* BIM B-813D distinguished by a high level of  $\beta$ -galactosidase production was performed. Genes *Bgal\_small\_N*, *lacZ1*, *bgaB1*, *bgaB2* and *bgaB3*, and *lacZ2*, encoding the synthesis of  $\beta$ -galactosidases, were revealed in the deciphered genome. It was shown that the genes *lacZ1*, *bgaB2*, and *bgaB3* characterized by an enhanced degree of similarity to the genes of closely related bifidobacterial species, presumably code for the enzymes catalyzing the specific reactions of hydrolysis and transglycosylation of carbohydrates. It was found that the enzymes BgaB1, BgaB2 and BgaB3 belong to the GH42 family of glycosyl hydrolases, whereas the enzymes LacZ1 and LacZ2 – to the GH2 family. The genome domains responsible for the synthesis of  $\beta$ -galactosidases in the strain *B. longum* BIM B-813D were studied in detail. A comparative analysis of the locus of *lacZ1* in *B. longum* BIM B-813D and the similar genome fragment AS143\_01230 from *B. longum* subsp. *longum* MC-42 detected the presence of the transposase gene ISL3 in the former strain. It was suggested that the insertion of the sequence of ISL3 in the *lacZ1* locus resulted in the modified gene expression and the increased production of  $\beta$ -galactosidase in the strain *B. longum* BIM B-813D.

**Keywords:** bifidobacteria, glycosyl hydrolases, *Bifidobacterium longum*,  $\beta$ -galactosidases, lactose hydrolysis, transglycosylation

**For citation:** Morozova A. N., Akhremchuk A. E., Golovnyova N. A. Molecular-genetic analysis of determinants encoding  $\beta$ -galactosidases of bacteria *Bifidobacterium longum* BIM B-813 D. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 274–284 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-274-284>

**Введение.** В настоящее время микробиота кишечного тракта рассматривается как значимая составляющая здоровья макроорганизма. Микроорганизмы, обитающие в кишечнике, продуцируют множество метаболитов, ферментов, витаминов и других биологически активных веществ, оказывают непосредственное воздействие на биохимические и иммунологические процессы

в организме хозяина [1]. Бифидобактерии – важнейшие представители микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и животных, которые широко используются в биотехнологических процессах при создании новых продуктов функционального питания и пробиотических добавок [2]. Специфика биологической активности бифидобактерий во многом обусловлена наличием у них широкого спектра гликозидаз, что позволяет им утилизировать разные углеводы и отражает высокую приспособленность к обитанию в кишечнике [3]. Приведенные в литературе результаты молекулярно-генетических исследований бактерий рода *Bifidobacterium* показали, что в их геномах содержится 8–15 % генов, контролирующих углеводный метаболизм [4].

Одной из основных групп ферментов, участвующих в метаболизме углеводов, являются гликозил-гидролазы [5], в частности  $\beta$ -галактозидаза ( $\beta$ -D-галактозид-галактогидролаза, EC 3.2.1.23) [6], главной функцией которой является гидролиз  $\beta$ -галактозидов с отщеплением остатка  $\beta$ -D-галактозы [7]. Штаммы бактерий, продуцирующие  $\beta$ -галактозидазы, могут быть успешно использованы в составе заквасок в молочной промышленности и для разработки продуктов функционального питания, в том числе с пониженным содержанием лактозы, с целью преодоления лактазной недостаточности. Кроме того, большой интерес вызывает способность  $\beta$ -галактозидаз в определенных условиях синтезировать галактоолигосахариды – пребиотики, избирательно стимулирующие рост полезных бактерий [8].

Цель данной работы – проведение молекулярно-генетического анализа детерминант, кодирующих синтез  $\beta$ -галактозидаз бактерий *B. longum* БИМ В-813Д.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлся штамм *Bifidobacterium longum* БИМ В-813 Д (реклассифицирован из *B. adolescentis* БИМ В-813 Д по результатам полногеномного секвенирования), полученный из штамма *B. longum* МС-42 (ранее – *B. adolescentis* МС-42) путем химического мутагенеза с последующей селекцией по уровню  $\beta$ -галактозидазной активности [9].

Аннотацию генома проводили с помощью конвейера аннотации прокариотических геномов НЦБИ США: Prokaryotic Genome Annotation Pipeline ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok)). Среднюю нуклеотидную идентичность (СНИ) рассчитывали с помощью веб-сервера Атласа микробных геномов MiGA (<http://microbial-genomes.org>). Для визуализации генетических карт использовали программу SnapGene Viewer 5.2. Спектр семейств гликозил-гидролаз ( $\text{GH}_5$ ) в исследуемом геноме был охарактеризован с помощью базы данных CAZy (<http://www.cazy.org/Genomes.html>). Для визуализации консервативных доменов исследуемых белков использовали сервис Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>). Сравнительный анализ белков с  $\beta$ -галактозидазной активностью у близкородственных видов *Bifidobacterium* проводили с помощью программы Blastp на сервере UniProt (<https://www.uniprot.org>). Для прогнозирования локализации белков использовали сервис PSORTb (<https://www.psорт.org/psортb/results.pl>), для сравнительного анализа транскрипционных факторов – базу данных RegPrecise (<https://regprecise.lbl.gov>).

**Результаты и их обсуждение.** Основываясь на том, что исходным штаммом, из которого селекционирован *B. longum* БИМ В-813 Д, является *B. longum* subsp. *longum* МС-42, особый интерес представляла сравнительная характеристика геномов *B. longum* БИМ В-813 Д [10] и *B. longum* subsp. *longum* МС-42 [11] (табл. 1).

Размер генома *B. longum* БИМ В-813 Д в данном сравнении больше, чем у родительского штамма. Вероятно, это связано с тем, что геном *B. longum* subsp. *longum* МС-42 собран не полностью, а представлен 29 контигами, отдельные из которых могут повторяться в геноме. Этим объясняется и отсутствие информации о количестве инсерционных последовательностей, а также разница в 0,2 % в ГЦ-составе геномов.

При анализе сходства видов путем расчета СНИ с помощью базы данных сервиса MiGA наиболее близкородственными к бактериям *B. longum* БИМ В-813 Д оказались штаммы *B. longum* subsp. *longum* CCUG30698 (98,89 % СНИ) и *B. longum* 105-A (98,87 % СНИ) (табл. 2).

Для выявления особенностей углеводного обмена *B. longum* БИМ В-813 Д детально рассмотрены области генома, кодирующие углевод-модифицирующие гликозил-гидролазы, которые позволяют бифидобактериям усваивать доступные питательные вещества и адаптироваться к условиям обитания в желудочно-кишечном тракте макроорганизма [12].

Таблица 1. Основные параметры геномов *B. longum* БИМ В-813 Д и *B. longum* subsp. *longum* МС-42Table 1. Major genome parameters of *B. longum* BIM B-813 D and *B. longum* subsp. *longum* MC-42

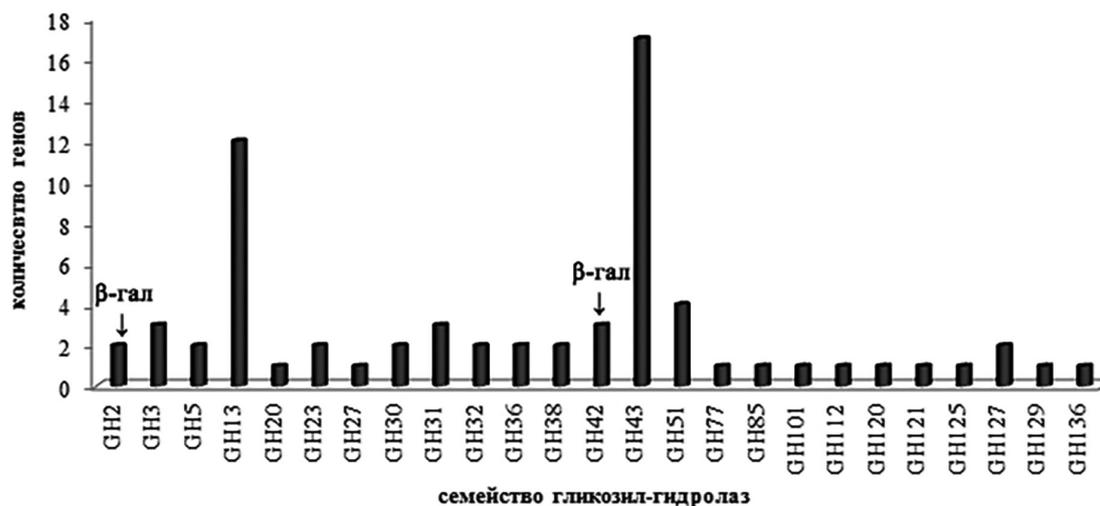
Параметр	<i>B. longum</i> БИМ В-813 Д	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> МС-42
Код доступа в базе данных ГенБанка	CP060493.1	LNCM00000000
Статус генома (кол-во контигов)	Полная последовательность	Контиги (последовательность представлена 29 фрагментами LNCM01000001.1–LNCM01000024.1)
Размер генома, п. н.	2 305 513	2 287 827
Доля ГЦ-пар, %	60	59,8
Наличие плазмид	Нет	Нет
Гены, <i>n</i>	1896	1883
Гены, кодирующие белки, <i>n</i>	1745	1782
рРНК	12	4
тРНК	56	51
Инсерционные последовательности, <i>n</i>	52	?
Псевдогены, <i>n</i>	80	46
CRISPR-регион	2	2
Литературная ссылка	[10]	[11]

Таблица 2. Сравнение генома *B. longum* БИМ В-813 Д с геномами близкородственных бифидобактерийTable 2. Comparison of *B. longum* BIM B-813 D genome with genomes of closely related bifidobacteria

Штамм (код доступа в ГенБанке)	Общий размер генома, п. н.	ГЦ, %	СНИ*, %
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> CCUG30698 (NZ_CP011965)	2 458 004	60,2	98,89
<i>Bifidobacterium longum</i> 105-A (NZ_AP014658)	2 290 145	60,1	98,87
<i>Bifidobacterium longum</i> 35624 (NZ_CP013673)	2 264 056	60	98,83
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> JCM 1217 <sup>T</sup> (NC_015067)	2 385 164	60,3	98,81
<i>Bifidobacterium longum</i> NCTC11818 <sup>T</sup> (NZ_LR134369)	2 385 160	60,3	98,81

\*СНИ между близкородственным штаммом и *B. longum* БИМ В-813 Д.

В геноме *B. longum* БИМ В-813 Д с помощью базы данных CAZy (<http://www.cazy.org/b19291.html>) определено 25 различных семейств генов, кодирующих синтез гликозил-гидролаз (рис. 1). Значительное количество гликозил-гидролаз у *B. longum* БИМ В-813 Д свидетельствует об их важной роли в метаболизме углеводов растительного и животного происхождения [13]. Наибольшее

Рис. 1. Семейства гликозил-гидролаз *B. longum* БИМ В-813 ДFig. 1. Glycosyl hydrolases families detected in *B. longum* BIM B-813 D

количество гликозил-гидролаз в геноме *B. longum* БИМ В-813 Д относится к семействам GH13 ( $\alpha$ -глюкозидазы) и GH43 ( $\alpha$ -арабинофуранозидазы и  $\beta$ -ксилозидазы).

Анализ генома *B. longum* БИМ В-813 Д показал, что способность ферментировать лактозу и другие  $\beta$ -галактозиды у исследуемого штамма обеспечивается как минимум пятью  $\beta$ -галактозидазами и одной  $\beta$ -глюкуронидазой/ $\beta$ -галактозидазой, принадлежащими к семействам GH2 и GH42 (рис. 1). По данным CAZy, белки, представляющие собой продукты генов H8S96\_05575 (*lacZ1*) и H8S96\_06090 (*lacZ2*), являются представителями семейства GH2.  $\beta$ -Галактозидазы, кодируемые детерминантами H8S96\_05555, H8S96\_06560 и H8S96\_07185 (далее обозначены как *bgaB1*, *bgaB2* и *bgaB3* соответственно), относятся к семейству GH42. У *B. longum* БИМ В-813 Д обнаружен также домен H8S96\_01940, представленный в базах данных как *Bgal\_small\_N* (малая субъединица димерной  $\beta$ -галактозидазы).

Проведен сравнительный анализ генетических детерминант, кодирующих  $\beta$ -галактозидазы близкородственных видов бифидобактерий, и определены последовательности, имеющие высокую степень гомологии с генами  $\beta$ -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813 Д. Результаты сравнительного анализа представлены в табл. 3.

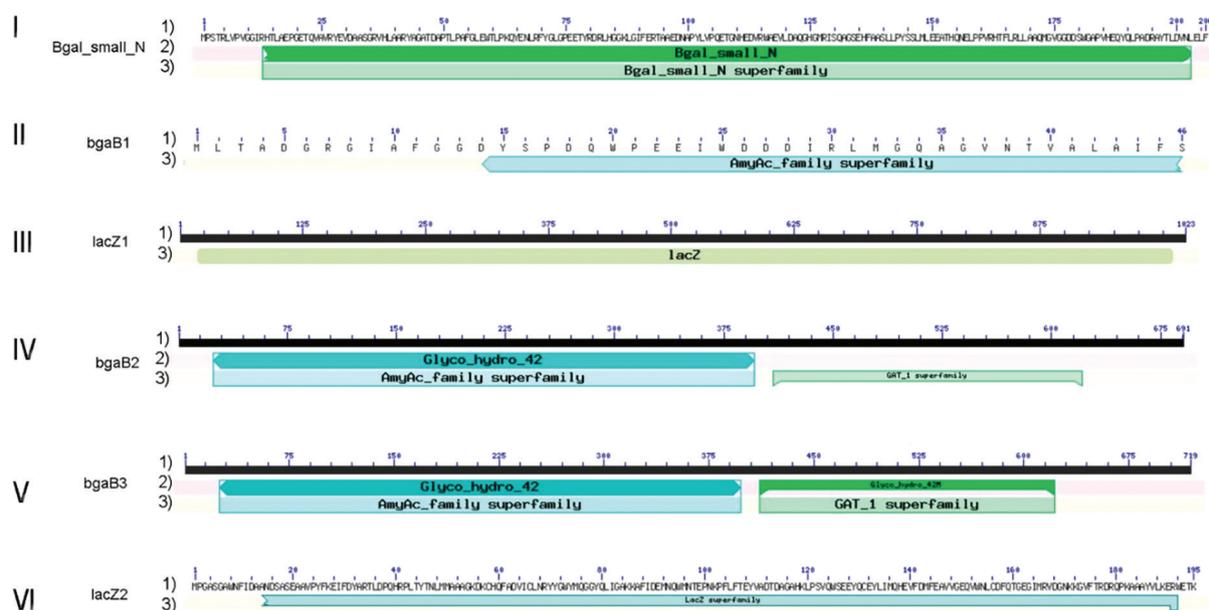
Таблица 3. Сравнительный анализ детерминант, определяющих синтез  $\beta$ -галактозидаз, в геномах *B. longum* БИМ В-813 Д и близкородственных видов

Table 3. Comparative analysis of determinants governing the synthesis of  $\beta$ -galactosidases in the genomes of *B. longum* BIM В-813 D and closely related species

Номер локуса (ген)	Штаммы со схожими генами	Степень сходства, %	Ген/локус	Основная функция продукта гена
H8S96_01940 ( <i>Bgal_small_N</i> )	<i>B. longum</i> NCC 2705	97,5	BL1775	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
	<i>B. scardovii</i> LMG 21589	79,7	BSCA_0794	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
	<i>B. callitrichos</i> DSM 23973	75,1	BCAL_2078	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
H8S96_05555 ( <i>bgaB1</i> )	<i>B. bifidum</i> BGN4	89,1	<i>bgaB</i>	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703	89,1	<i>bgaB</i>	Гидролиз трансгалактоолигосахаридов. Высокоактивен в отношении Гал( $\beta$ 1–4)Гал и Гал( $\beta$ 1–6)-Гал-содержащих олигосахаридов
	<i>B. angulatum</i> DSM 20098	84,8	BIFANG_03660	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
H8S96_05575 ( <i>lacZ1</i> )	<i>B. longum</i> NCC 2705	99,6	<i>lacZ</i>	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах; трансгликозилирование
	<i>B. adolescentis</i> (ATCC 15703/ DSM 20083/NCTC 11814/ E194a)	82	BAD_1605	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах; трансгликозилирование
	<i>B. mongoliense</i> DSM 21395	79,8	BMON_1218	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах; трансгликозилирование
H8S96_06560 ( <i>bgaB2</i> )	<i>B. longum</i> NCC 2705	99,9	<i>bga</i>	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
	<i>B. callitrichidarum</i> TRI 5	96,1	DF196_09550	Гидролиз концевых остатков $\beta$ -D-галактозы в $\beta$ -галактозидах
	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> HL96	95,9	<i>beta-galIII</i>	Специфичен для $\beta$ -D-аномер-связанных галактозидных субстратов. Гидролизует о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид (ONP-Gal) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактозид (X-Gal) и в меньшей степени лактозу. Перенос $\beta$ -D-галактозы на молекулу $\beta$ -D-галактозидов (трансгликозилирование)

Номер локуса (ген)	Штаммы со схожими генами	Степень сходства, %	Ген/локус	Основная функция продукта гена
H8S96_07185 ( <i>bgaB3</i> )	<i>B. longum</i> NCC 2705	84,6	<i>bgaB</i>	Гидролиз концевых остатков β-D-галактозы в β-галактозидах; трансгликозилирование
	<i>B. callitrichidarum</i> TRI 5	80,5	DF196_03110	Гидролиз концевых остатков β-D-галактозы в β-галактозидах; трансгликозилирование
H8S96_06090 ( <i>lacZ2</i> )	<i>B. scardovii</i> LMG 21589	86,1	BSCA_1953	Гидролиз O-гликозидных связей в β-галактозидах
	<i>B. goeldii</i> 2034B	83,3	D2E25_0287	Гидролиз O-гликозидных связей в β-галактозидах
	<i>B. callitrichos</i> DSM 23973	82,5	BCAL_1854	Гидролиз сложных углеводов

Основываясь на том, что β-галактозидазная активность штамма *B. longum* БИМ В-813 Д на порядок выше, чем у исходного *B. longum* subsp. *longum* MC-42, особый интерес представлял сравнительный анализ областей геномов *B. longum* БИМ В-813 Д и *B. longum* subsp. *longum* MC-42, кодирующих β-галактозидазы. Последовательность генома *B. longum* subsp. *longum* MC-42 представлена 29 участками (LNCM01000001.1–LNCM01000029.1), которые находятся в открытом доступе в базе данных НЦБИ США [10]. В геноме *B. longum* subsp. *longum* MC-42 выявлены гены, кодирующие синтез трех β-галактозидаз: AS143\_00255, AS143\_01230 и AS143\_04190. Результаты сравнительного анализа показали, что области, кодирующие β-галактозидазы *bgaB3* *B. longum* БИМ В-813 Д и AS143\_04190 *B. longum* subsp. *longum* MC-42, идентичны на 99,72 %. Детальный анализ аминокислотных последовательностей позволил выявить замену двух аминокислот – у *BgaB3* *B. longum* БИМ В-813 Д произошла замена в 164-м кодоне (164C→164W) и в 582-м кодоне (582V→582A). Транскрипционные факторы *lacI*, координирующие синтез данных β-галактозидаз, полностью совпадают. Последовательность H8S96\_06560, кодирующая фермент *BgaB2*, на 100 %



1) последовательность; 2) консервативные домены; 3) надсемейства

Рис. 2. Расположение консервативных доменов в пределах аминокислотных последовательностей белков, кодирующих β-галактозидазы *B. longum* БИМ В-813 Д; I – *bga\_small\_N*; II – *bgaB1*; III – *lacZ1*; IV – *bgaB2*; V – *bgaB3*; VI – *lacZ2*

Fig. 2. Localization of conservative domains within the amino acid sequences of proteins encoding β-galactosidases of *B. longum* BIM В-813 D: I I – *bga\_small\_N*; II – *bgaB1*; III – *lacZ1*; IV – *bgaB2*; V – *bgaB3*; VI – *lacZ2*

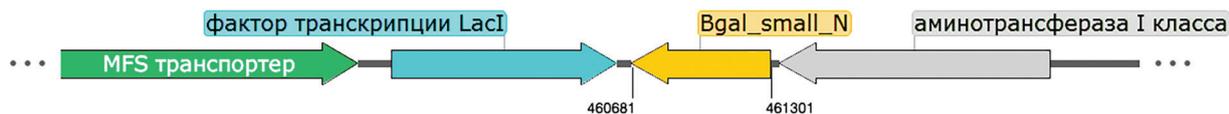


Рис. 3. Генетическая карта локуса, определяющего синтез  $\beta$ -галактозидазы *Bgal\_small\_N* бактерии *B. longum* БИМ В-813 Д (обозначены координаты расположения в геноме гена *Bgal\_small\_N*, кодирующего  $\beta$ -галактозидазу; указаны предсказанные функции продуктов генов)

Fig. 3. Genetic map of the locus defining the synthesis of  $\beta$ -galactosidase *Bgal\_small\_N* in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (for gene *Bgal\_small\_N* encoding  $\beta$ -galactosidase precise position in the genome is indicated; predicted functions of gene products are specified)

идентична последовательности AS143\_00255 у *B. longum* subsp. *longum* MC-42. Также выявлено 100 %-ное совпадение областей геномов *lacZ1* *B. longum* БИМ В-813 Д и AS143\_01230 родительского штамма, но в данном локусе выявлены изменения в регуляции экспрессии гена *lacZ1*.

Как отмечалось ранее, в геноме штамма *B. longum* БИМ В-813 Д выявлено 6 локусов, предположительно обеспечивающих синтез  $\beta$ -галактозидаз. На основании анализа структурного сходства и аминокислотной последовательности белков представлены консервативные домены исследуемых  $\beta$ -галактозидаз (см. рис. 2).

Рассмотрим более подробно особенности строения и локализации исследуемых  $\beta$ -галактозидаз *B. longum* БИМ В-813 Д.

$\beta$ -Галактозидаза *Bgal\_small\_N* (малая цепь  $\beta$ -галактозидазы) – уникальный белок, состоящий из 206 а. о. (рис. 3). Данная  $\beta$ -галактозидаза является представителем надсемейства *Bgal\_small\_N* (smart01038) (см. рис. 2, I). По данным ресурса SMART ([http://smart.embl.de/smart/do\\_annotation.pl?DOMAIN=SM01038](http://smart.embl.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=SM01038)), домен обнаруживается, как правило, в N-конце малой цепи димерных  $\beta$ -галактозидаз. Основной функцией *Bgal\_small\_N* является связывание лиганда с образованием замкнутой конформации белка [14].

Ген *bgaB1* кодирует  $\beta$ -галактозидазу с молекулярной массой 5 кДа. Данный белок состоит всего из 46 а. о., что, по всей видимости, является результатом делеции в этом локусе. На основании нуклеотидной последовательности гена *bgaB1* определена первичная структура белка, характерная для надсемейства каталитических доменов альфа-амилазы *AmyAc* (cl38930) (см. рис. 2, II). Большинство ферментов с аналогичными последовательностями гидролизуют крахмал, гликоген и родственные олиго- и полисахариды [15]. Отличительной особенностью является наличие рядом с кластером, кодирующим фермент, локуса ДНК, кодирующего домен тримеризации данной  $\beta$ -галактозидазы – H8S96\_05550 (рис. 4).

$\beta$ -Галактозидаза *LacZ1* – продукт гена H8S96\_05575 (*lacZ1*), является белком с молекулярной массой 114,5 кДа, состоящим из 1023 а. о. Фермент относится к семейству GH2 гликозил-гидролаз, к представителям надсемейства *lacZ* (cl35850) (см. рис. 2, III). С помощью сервиса PSORTb определена предполагаемая локализация  $\beta$ -галактозидазы *LacZ1* – с высокой вероятностью данный белок является цитоплазматическим, что подтверждается результатами предыдущих исследований [16]. Анализ данного локуса генома показал, что рядом с областью, кодирующей *lacZ1*, встроен мобильный элемент ISL3, который потенциально может влиять на регуляцию экспрессии  $\beta$ -галактозидазы *LacZ1* [17]. При сравнении локуса H8S96\_05575 (*lacZ1*) *B. longum* БИМ В-813 Д и сходной области генома AS143\_01230 *B. longum* subsp. *longum* MC-42 установлено, что у *B. longum* БИМ В-813 Д в данном локусе присутствует ген транспозазы ISL3 (рис. 4). Предполагается, что наличие инсерционной последовательности ISL3 в области *lacZ1* приводит к изменению экспрессии гена и увеличению продукции  $\beta$ -галактозидазы.

$\beta$ -Галактозидаза *BgaB2*, белок с молекулярной массой 77,4 кДа, является продуктом гена *bgaB2* и входит в состав семейства GH42 гликозил-гидролаз. Нуклеотидная последовательность кодирует белок из 691 а. о., содержит консервативную последовательность, характерную для семейства GH42 (pfam02449; CDD:396834), и домен глутаминамидотрансферазы 1-го типа GAT 1 (cl00020; CDD:412116) (см. рис. 2, IV). Экспрессия гена *bgaB2* контролируется репрессорами типа *LacI* и АТФ-зависимыми транспортными белками семейства ABC (рис. 5). Для синтеза *BgaB2*

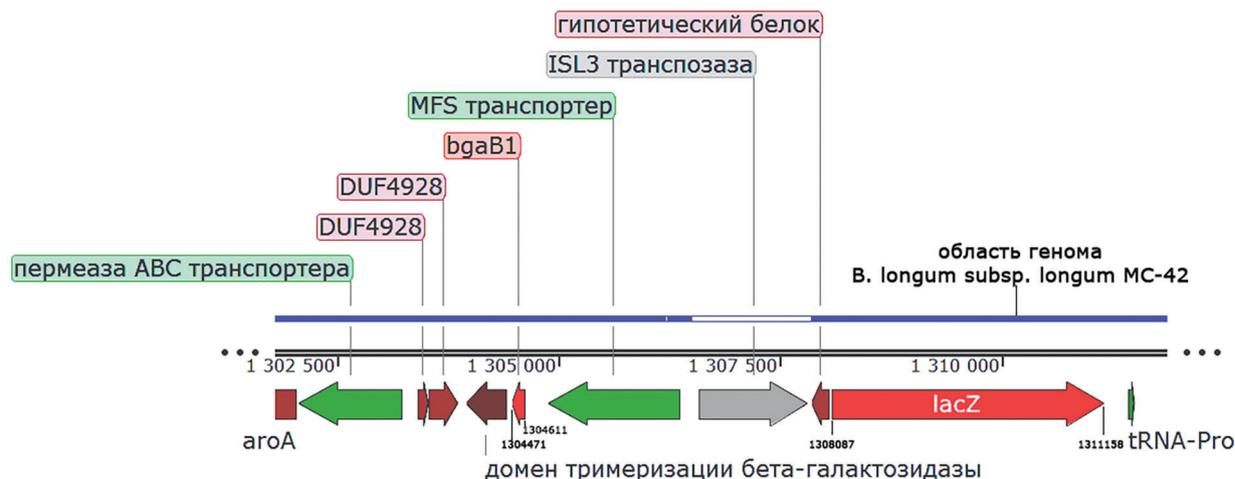


Рис. 4. Генетическая карта локуса, определяющего синтез  $\beta$ -галактозидаз BgaB1 и LacZ1 бактерий *B. longum* BIM B-813 D (указаны предсказанные функции продуктов генов; обозначены координаты расположения в геноме генов *bgaB1* и *lacZ1*, кодирующих  $\beta$ -галактозидазу; отмечен гомологичный участок генома *B. longum* subsp. *longum* MC-42)

Fig. 4. Genetic map of the locus determining the synthesis of  $\beta$ -galactosidases BgaB1 and LacZ1 in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (the functions of gene products were predicted; genes *bgaB1* and *lacZ1* encoding  $\beta$ -galactosidases are positioned in accordance with the exact localization in the genome; a homologous locus of *B. longum* subsp. *longum* MC-42 genome was marked)

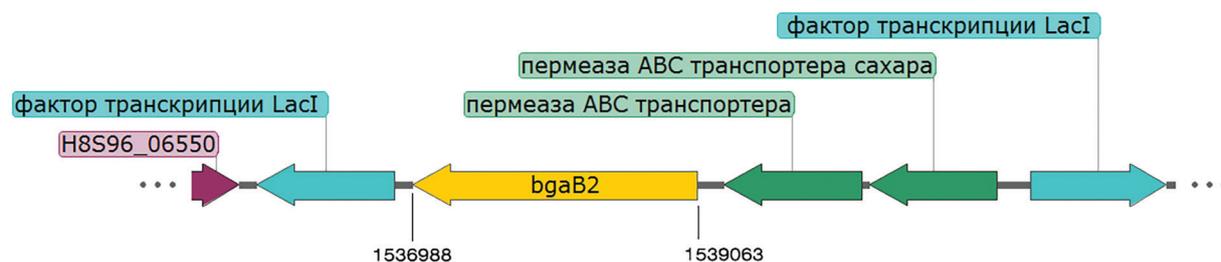


Рис. 5. Генетическая карта локуса, кодирующего синтез  $\beta$ -галактозидазы BgaB2 бактерий *B. longum* BIM B-813 D (обозначены координаты расположения в геноме гена *bgaB2*, кодирующего  $\beta$ -галактозидазу; указаны предсказанные функции продуктов генов)

Fig. 5. Genetic map of the locus of BgaB2 encoding the synthesis of  $\beta$ -galactosidase in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (gene *bgaB2*, encoding  $\beta$ -galactosidases production is positioned in a strict compliance with its localization in the genome; the functions of gene products are predicted)

важным является транскрипционный фактор LacR из семейства LacI, специфичный к аллолактозе (конформационной форме лактозы), ген которого расположен рядом с геном  $\beta$ -галактозидазы *bgaB2* и контролирует экспрессию лактозного оперона [18]. Транспортёры типа ABC являются первичными, содержат АТФ-связывающие домены, которые обладают АТФазной активностью для перемещения субстратов через мембраны клеток. ABC-транспортёр состоит из двух пермеаз и связывающего белка [19].

Посредством сервиса PSORTb определена предполагаемая локализация  $\beta$ -галактозидазы BgaB2. Полученные данные указывают на высокую вероятность внутриклеточной локализации белка BgaB2, что подтверждается также результатами предыдущих исследований [16].

$\beta$ -Галактозидаза BgaB3, продукт гена *bgaB3*, представляет собой белок с молекулярной массой 79,8 кДа, который состоит из 719 а. о. Фермент относится к семейству GH42 гликозил-гидролаз. Область, кодирующая фермент, состоит из двух участков: непосредственно  $\beta$ -галактозидазы GH42 (pfam02449, CDD:396834) и домена глутаминамидотрансферазы 1-го типа GAT 1 (pfam08532, CDD:396931) (см. рис. 2, V). Установлено, что в опероне, кодирующем синтез  $\beta$ -галактозидазы BgaB3, находятся транспортёры, которые отвечают за доставку углеводов в клетку: система ABC –

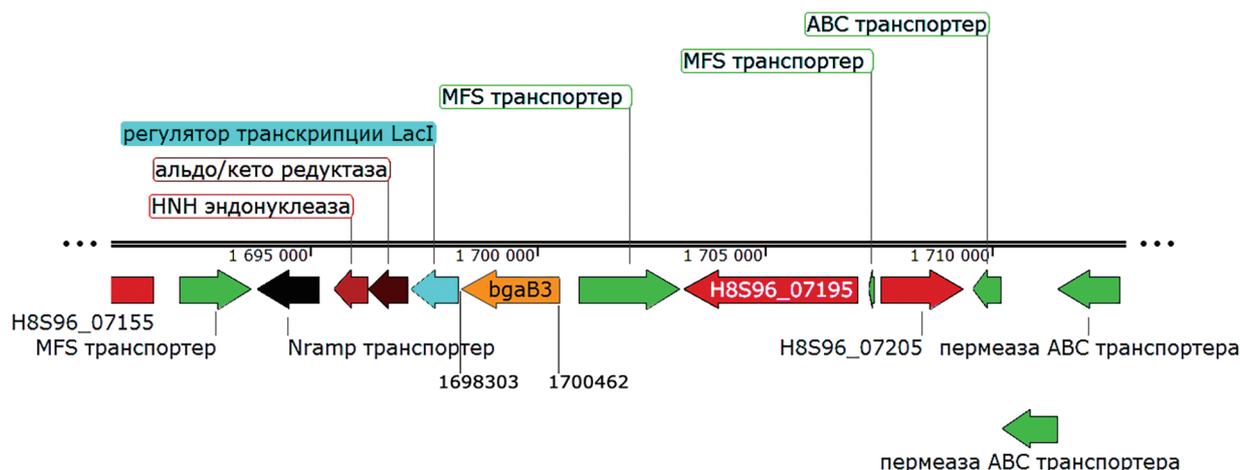


Рис. 6. Генетическая карта локуса, определяющего синтез  $\beta$ -галактозидазы BgaB3 у бактерий *B. longum* БИМ В-813 Д (обозначены координаты расположения в геноме гена *bgaB3*, кодирующего  $\beta$ -галактозидазу; указаны предсказанные функции продуктов генов)

Fig. 6. Genetic map of the locus of BgaB3 defining the synthesis of  $\beta$ -galactosidase in bacteria *B. longum* BIM B-813 D (genome localization of gene *bgaB3* encoding the  $\beta$ -galactosidase synthesis is provided; the predicted functions of gene products are described)

для лактозы, раффинозы и мальтозы, система MFS – для лактозы, глюкозы и сахарозы (рис. 6). Отличительной особенностью данной области является присутствие транспортера NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins) (рис. 6), относящегося к семейству высококонсервативных мембранных белков, осуществляющих транспорт ионов различных металлов –  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  и др., что может указывать на потенциальную возможность регуляции синтеза  $\beta$ -галактозидазы BgaB3 ионами металлов [20].

Как и в случае с  $\beta$ -галактозидазой BgaB2, у BgaB3 рядом с областью, кодирующей синтез фермента, располагается ген-регулятор лактозного оперона – *lacI*, который кодирует белок-репрессор (рис. 6). Кроме того, перед промотором *lac*-оперона располагается сайт связывания с активаторным белком БАК (БРЦ), который усиливает транскрипцию данного оперона.

Анализ области генома показал, что рядом с локусом, кодирующим синтез BgaB3, находится большое количество мобильных генетических элементов типа IS, которые могут изменять работу генов, влияя на регуляцию их экспрессии [17]. В пределах 22 000 п. н. рядом с областью гена *bgaB3* располагается 9 инсерционных последовательностей шести семейств: IS21, ISL3, IS1249, IS110, IS256 и ISB1o2.

Таким образом, установлено, что у *B. longum* БИМ В-813 Д гены утилизации лактозы и других галактозосодержащих углеводов собраны в отдельные кластеры, в которые входят гены регуляторов транскрипции, MFS- и ABC-транспортеры,  $\beta$ -галактозидазы и пермеазы. Экспрессия генов, участвующих в углеводном метаболизме, контролируется репрессорами типа LacI.

С использованием базы данных RegPrecise проведена сравнительная характеристика транскрипционных факторов, выявленных у *B. longum* БИМ В-813 Д, с таковыми у близкородственных штаммов. В геноме *B. longum* БИМ В-813 Д нами выявлено 29 транскрипционных факторов из семейства LacI, которые регулируют экспрессию генов, участвующих в катаболизме углеводов, в ответ на изменение доступных для клеток субстратов. Синтез ферментов, вовлеченных в метаболизм лактозы, у бифидобактерий координируется преимущественно транскрипционным фактором LacR из семейства LacI [21]. Транскрипционные факторы утилизации галактосахаров *B. longum* БИМ В-813 Д и близкородственных штаммов, представленных в коллекции регулонов прокариотических геномов RegPrecise, детально рассмотрены в табл. 4.

Для всех представленных в табл. 4 видов бифидобактерий установлено, что экспрессия генов утилизации лактозы находится под контролем транскрипционных факторов LacR, которые относятся к консервативным регуляторам метаболизма лактозы и сохраняются у большинства видов

бифидобактерий. Данные факторы транскрипции контролируют небольшой набор генов определенного метаболического пути. Для *B. longum* БИМ В-813 Д показано наличие транскрипционного фактора GalR2 из семейства LacI, регулирующего метаболизм лактозы и галактозы. Участие равнозначных транскрипционных факторов, отвечающих за метаболизм одних и тех же углеводов, обеспечивают альтернативные варианты регуляторных путей у *B. longum* БИМ В-813 Д [22].

Т а б л и ц а 4. Сравнительный анализ транскрипционных факторов утилизации углеводов *B. longum* БИМ В-813 Д с аналогичными регуляторами транскрипции у близкородственных штаммов

Table 4. Comparative analysis of the transcription factors controlling the utilization of carbohydrates in *B. longum* BIM В-813 D versus the corresponding transcription controllers in closely related bacterial strains

Регулятор транскрипции	<i>B. longum</i> БИМ В-813 Д	<i>B. adolescentis</i> TCC 15703	<i>B. longum</i> NCC2705	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	Субстраты регулируемых метаболических путей
BfrR	+	+		+	Фруктоолигосахариды
BgaR	+		+		Бета-галактозиды
GalR2	+				Галактоза, лактоза
GlcR	+	+	+	+	Глюкоза
LacR	+	+	+	+	Лактоза
MsmR	+	+		+	Альфа-галактозиды
RafR	+	+	+	+	Раффиноза

П р и м е ч а н и е. Знаком «+» отмечено наличие транскрипционного фактора.

**Заклучение.** Анализ нуклеотидной последовательности генома *B. longum* БИМ В-813 Д позволил выявить гены *Bgal\_small\_N*, *lacZ1*, *bgaB1*, *bgaB2* и *bgaB3* и *lacZ2*, кодирующие синтез β-галактозидаз. Ферменты BgaB1, BgaB2 и BgaB3 принадлежат к семейству GH42 гликозил-гидролаз, а LacZ1 и LacZ2 – к семейству GH2. Установлено, что *lacZ1*, *bgaB2* и *bgaB3* характеризуются высокой степенью идентичности с генами близкородственных видов бифидобактерий и, как предполагается, кодируют ферменты, осуществляющие специфические реакции гидролиза и трансгликозилирования углеводов. Возможно, высокая β-галактозидазная активность исследуемого штамма *B. longum* БИМ В-813 Д обусловлена горизонтальным переносом ISL3 элемента в область, регулируемую экспрессию гена *lacZ1*. Выявлены транспортеры, являющиеся связующим звеном внутриклеточного углеводного метаболизма, а также проанализированы транскрипционные факторы, координирующие работу систем утилизации углеводов. Обнаружено присутствие транскрипционных факторов из семейства LacI, отвечающих за метаболизм лактозы у *B. longum* БИМ В-813 Д. Представленные результаты являются основой для детальных исследований β-галактозидаз бифидобактерий.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность за помощь в работе сотрудникам Центра аналитических и гено-инженерных исследований Института микробиологии НАН Беларуси и лично канд. биол. наук Леониду Николаевичу Валеновичу.

**Acknowledgements.** The authors express sincere gratitude to the researches of the Center for Analytical and Genetic Engineering Research of the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus and personally to Leonid N. Valenovich, Ph. D.

#### Список использованных источников

1. Микробиота / под ред. Е. Л. Никонова, Е. Н. Поповой. – М. : Медиа Сфера, 2019. – 256 с.
2. Mitsuoka, T. Development of functional foods / T. Mitsuoka // Biosci. Microbiota Food Health. – 2014. – Vol. 33, N 3. – P. 117–128. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.117>
3. Rodriguez, C. I. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments / C. I. Rodriguez, J. B. H. Martiny // BMC Genomics. – 2020. – Vol. 21, N 1. – Art. 26. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6435-1>
4. Klijn, A. Lessons from the genomes of bifidobacteria / A. Klijn, A. Mercenier, F. Arigoni // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 29, N 3. – P. 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.010>
5. Pokusaeva, K. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria* / K. Pokusaeva, G. F. Fitzgerald, D. van Sinderen // Genes Nutr. – 2011. – Vol. 6, N 3. – P. 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
6. Uchil, P. D. β-Galactosidase / P. D. Uchil, A. Nagarajan, P. Kumar // Cold Spring Harb. Protoc. – 2017. – Vol. 2017, N 10. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096198>

7. Zolnere, K. The comparison of commercially available  $\beta$ -galactosidases for dairy industry: review / K. Zolnere, I. Ciprovica // The Annual 23th International scientific conference “Research for Rural Development 2017” (Jelgava (Latvia), May 17–19, 2017) / Latvia Univ. of Agriculture. – Jelgava, 2017. – Vol. 1. – P. 215–222.
8. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates / C. Guerrero [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2015. – Vol. 70. – P. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
9. Морозова, А. Н. Использование химического мутагенеза для получения штамма бифидобактерий с повышенной продукцией  $\beta$ -галактозидазы / А. Н. Морозова, Н. А. Головнева // Молодежь в науке – 2011 : материалы Междунар. науч. конф. молодых ученых, г. Минск, 25–29 апр. 2011 г. : в 5 ч. – Минск, 2012. – Ч. 3 : Сер. биол. наук ; Сер. мед. наук / редкол. : И. Д. Вологовский (гл. ред.) [и др.]. – С. 132–135.
10. Морозова, А. Н. Особенности генома *Bifidobacterium longum* БИМ В-813Д, отражающие адаптацию бактерий к среде обитания / А. Н. Морозова, А. Э. Охремчук, Н. А. Головнева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / редкол. : Э. И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 13. – С. 66–76.
11. Tupikin, A. E. Draft genome sequence of the probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strain MC-42 / A. E. Tupikin, A. I. Kalmykova, M. Kabilov // *Genome Announc.* – 2016. – Vol. 4, N 6. – P. e01411-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01411-16>
12. Devika, N. T. Deciphering the metabolic capabilities of *Bifidobacteria* using genome-scale metabolic models / N. T. Devika, K. Raman // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, N 1. – Art. 18222. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54696-9>
13. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota / A. E. Kaoutari [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – Vol. 11, N 7. – P. 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
14. A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*),  $\beta$ -galactosidase / D. H. Juers [et al.] // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40, N 49. – P. 14781–14794. <https://doi.org/10.1021/bi011727i>
15.  $\alpha$ -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases / Š. Janeček [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – Vol. 71, N 7. – P. 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
16. Galactosidases of strain *Bifidobacterium Longum* Bim B-813d with transglycosylating activity / A. Morozova [et al.] // *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* – 2021. – N 2. <https://doi.org/10.11134/btp.2.2021.5>
17. Guglielmetti, S. Mobilome and genetic modification of bifidobacteria / S. Guglielmetti, B. Mayo, P. Álvarez-Martín // *Beneficial Microbes.* – 2013. – Vol. 4, N 2. – P. 143–166. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0031>
18. Structural explanation for allolactose (*lac* operon inducer) synthesis by *lacZ*  $\beta$ -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the *lac* repressor / R. W. Wheatley [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, N 18. – P. 12993–3005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455436>
19. Zafar, H. Comparative analyses of the transport proteins encoded within the genomes of nine bifidobacterium species / H. Zafar, M. H. Saier (Jr.) // *Microb. Physiol.* – 2022. – Vol. 32, N 1–2. – P. 30–44. <https://doi.org/10.1159/000518954>
20. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter / H. Gunshin [et al.] // *Nature.* – 1997. – Vol. 388, N 6641. – P. 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>
21. Comparative genomics and evolution of regulons of the LacI-family transcription factors / D. A. Ravcheev [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – Art. 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00294>
22. Genomics of the genus bifidobacterium reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment / C. Milani [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2016. – Vol. 82, N 4. – P. 980–991. <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>

## References

1. Nikonova E. L., Popova E. N. (eds.). *Mikrobiota*. Moscow, Media Sfera Publ., 2019. 256 p. (in Russian).
2. Mitsuoka T. Development of functional foods. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2014, vol. 33, no. 3, pp. 117–128. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.117>
3. Rodriguez C. I., Martiny J. B. H. Evolutionary relationships among bifidobacteria and their hosts and environments. *BMC Genomics*, 2020, vol. 21, no. 1, art. 26. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6435-1>
4. Klijn A., Mercenier A., Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, vol. 29, no. 3, pp. 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.010>
5. Pokusaeva K., Fitzgerald D., van Sinderen G. F. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes and Nutrition*, 2011, vol. 6, no. 3, pp. 285–306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
6. Uchil P. D., Nagarajan A., Kumar P.  $\beta$ -Galactosidase. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, vol. 2017, no. 10. <https://doi.org/10.1101/pdb.top096198>
7. Zolnere K. Ciprovica I. The comparison of commercially available  $\beta$ -galactosidases for dairy industry: review. *The Annual 23th International scientific conference “Research for Rural Development 2017” (Jelgava (Latvia), May 17–19, 2017)*. Vol. 1. Jelgava, 2017, pp. 215–222.
8. Guerrero C., Vera C., Conejeros R., Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, vol. 70, pp. 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.006>
9. Morozova A. N., Golovneva N. A. The use of chemical mutagenesis to generate a strain of bifidobacteria with increased production of  $\beta$ -galactosidase. *Molodezh' v nauke – 2011: materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii molodykh uchenykh (g. Minsk, 25–29 aprelya 2011 goda). Chast' 3: Seriya biologicheskikh nauk; Seriya meditsinskikh nauk* [Youth in Science – 2011: Proceedings of the International scientific conference of young scientists (Minsk, April 25–29, 2011). Part 3: Biological sciences series; Medical sciences series]. Minsk, 2011, pp. 132–135 (in Russian).

10. Morozova A. N., Okhremchuk A. E., Golovneva N. A. Genome characteristics of *Bifidobacterium longum* BIM B-813D, reflecting the ability of bacteria to adapt to the environment. *Mikrobnaya biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnyye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 13* [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works. Volume 13]. Minsk, 2021, pp. 66–76 (in Russian).
11. Tupikin A. E., Kalmykova A. I., Kabilov M. Draft genome sequence of the probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strain MC-42. *Genome Announcements*, 2016, vol. 4, no. 6, pp. e01411-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01411-16>
12. Devika N. T., Raman K. Deciphering the metabolic capabilities of *Bifidobacteria* using genome-scale metabolic models. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 18222. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54696-9>
13. Kaoutari A., Armougom F., Gordon J. I., Raoult D., Henrissat B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, vol. 11, no. 7, pp. 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
14. Juers D. H., Heightman T. D., Vasella A., McCarter J. D., Mackenzie L., Withers S. G., Matthews B. W. A Structural view of the action of *Escherichia coli* (lacZ),  $\beta$ -galactosidase. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, no. 49, pp. 14781–14794. <https://doi.org/10.1021/bi011727i>
15. Janeček Š., Svensson B., MacGregor E. A.  $\alpha$ -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, vol. 71, no. 7, pp. 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
16. Morozova A., Golovnyova N., Ryabaya N., Safonova M. Galactosidases of strain *Bifidobacterium Longum* Bim B-813d with transglycosylating activity. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2021, no. 2. <https://doi.org/10.11134/btp.2.2021.5>
17. Guglielmetti S., Mayo B., Álvarez-Martín P. Mobilome and genetic modification of bifidobacteria. *Beneficial Microbes*, 2013, vol. 4, no. 2, pp. 143–166. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0031>
18. Wheatley R. W., Lo S., Jancewicz L. J., Dugdale M. L., Huber R. E. Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ  $\beta$ -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, no. 18, pp. 12993–3005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455436>
19. Zafar H., Saier M. H. (Jr.) Comparative analyses of the transport proteins encoded within the genomes of nine bifidobacterium species. *Microbial Physiology*, 2022, vol. 32, no. 1–2, pp. 30–44. <https://doi.org/10.1159/000518954>
20. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V., Gunshin Y., Romero M. F., Boron W. F., Nussberger S., Gollan J. L., Hediger M. A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6641, pp. 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>
21. Ravcheev D. A., Khoroshkin M. S., Laikova O. N., Tsoy O. V., Sernova N. V., Petrova S. A., Rakhmaninova A. B., Novichkov P. S., Gelfand M. S., Rodiono D. A. Comparative genomics and evolution of regulons of the LacI-family transcription factors. *Frontiers in Microbiology*, 2014, vol. 5, art. 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00294>
22. Milani Ch., Turrioni F., Duranti S., Lugli G. A., Mancabelli L., Ferrario Ch., Sinderen D., Ventura M. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, vol. 82, no. 4, pp. 980–991. <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>

### Информация об авторах

Морозова Антонина Николаевна – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: bifidoby@yandex.by

Охремчук Артур Эдуардович – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: okhrem4ukartur@yandex.ru

Головнева Наталья Алексеевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: biochem\_lab@mbio.bas-net.by

### Information about the authors

Antonina N. Morozova – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bifidoby@yandex.by

Artur E. Akhremchuk – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: okhrem4ukartur@yandex.ru

Natalia A. Golovnyova – Ph. D. (Biol.), 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: biochem\_lab@mbio.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 579.24  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-285-292>

Поступила в редакцию 14.03.2022  
Received 14.03.2022

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

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ – ОСНОВЫ МИКРОБНОГО УДОБРЕНИЯ «БИОТИЛИЯ»**

**Аннотация.** Изучена способность солеустойчивых ростстимулирующих фосфатсольубилизирующих *Priestia megaterium* Cp-1 и азотфиксирующих *Rhodococcus jostii* CA-6 штаммов расти на среде, содержащей углеводороды нефти (0,1 %) в качестве единственного источника углерода и энергии, а также ионы тяжелых металлов (0,1–5,0 ммоль/л), что обеспечивает этим штаммам жизнеспособность в условиях загрязнения почвы углеводородами, тяжелыми металлами и хлоридом натрия. Подобрана оптимальная питательная среда для роста и развития галотолерантных штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1, содержащая в качестве источника углерода побочный продукт свекло-сахарного производства мелассу в количестве 30 г/л (среда Мейнелла). Использование для засева питательной среды двухсуточного посевного материала *Rh. jostii* CA-6 и односуточного *P. megaterium* Cp-1 при скорости вращения шейкера (180 ± 10) об/мин является наиболее продуктивным. С целью получения титра штаммов-биоагентов не менее 1,0·10<sup>9</sup> КОЕ/мл при глубинном культивировании наиболее технологичным является использование посевного материала в количестве 5 % от объема среды. Раздельно культивируемые штаммы *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, составляющие основу микробного удобрения «Биотилия», при смешивании 1:1 сохраняют свою жизнеспособность на высоком и экологически значимом уровне ((1,67–2,2)·10<sup>9</sup> КОЕ/мл) через 3 мес. хранения при температуре от +4 до +15 °С.

**Ключевые слова:** технологические параметры, глубинное культивирование, микробное удобрение, засоление, выживаемость

**Для цитирования:** Культивирование солеустойчивых бактерий – основы микробного удобрения «Биотилия» / Н. И. Наумович [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 285–292. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-285-292>

**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*

## **CULTIVATION OF HALOTOLERANT BACTERIA AS A BASIS OF THE MICROBIAL FERTILIZER “BIOTILIA”**

**Abstract.** The ability of salt-resistant growth-promoting phosphate-solubilizing *Priestia megaterium* Cp-1 and nitrogen-fixing *Rhodococcus jostii* CA-6 strains to grow on the medium containing oil hydrocarbons (0.1 %) as the only carbon and energy source in the presence of heavy metal ions (0.1–5.0 mmol/l) providing the enhanced viability in soil contaminated with hydrocarbons, heavy metal and sodium chloride was investigated. The optimum nutrient medium was selected for the growth and development of halotolerant strains *Rh. jostii* CA-6 and *P. megaterium* Cp-1 comprising as a product of sugar refining – molasses as the carbon source in an amount of 30 g/l (Meynell medium). Application of 48h culture of *Rh. jostii* CA-6 and 24h culture of *P. megaterium* Cp-1 for inoculation of the nutrient medium grown at the agitation rate of the shaker (180 ± 10) rpm appears to be the most efficient fermentation method. To reach the titer of viable strains at least 1.0·10<sup>9</sup> CFU/ml in submerged culture, the most appropriate procedure envisages the introduction of a seed material in an amount of 5 % of nutrient medium volume. Separately cultured strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 – the basic components of the microbial fertilizer “Biotilia” are mixed in the 1:1 ratio and preserve their vital characteristics at an elevated eco-significant level ((1.67–2.2)·10<sup>9</sup> CFU/ml) in 3 months of storage in the temperature range of +4– +15 °C.

**Keywords:** technological parameters, submerged cultivation, microbial fertilizer, salinization, survival rate

**For citation:** Naumovich N. I., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronava H. V. Cultivation of halotolerant bacteria as a basis of the microbial fertilizer “Biotilia”. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyologichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 285–292 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-285-292>

**Введение.** Одними из основных источников антропогенных загрязнений, оказывающих негативное влияние на зеленые насаждения в городах и вызывающих засоление почвы, являются противогололедные реагенты, применяемые в зимний период [1]. В Республике Беларусь в качестве противогололедного реагента используют минеральный концентрат галит, состоящий

из натрия хлористого технического с примесями других химических веществ, который негативно влияет на почву и растения, произрастающие вдоль транспортных автомагистралей (по ТУ РБ 600122610.016-2002).

В минимизации негативного воздействия соли на почвы и растительные организмы перспективным и эффективным направлением является биоремедиация – использование микробных препаратов, созданных на основе микроорганизмов, выделенных из засоленных природных экосистем. Среди них значимое место принадлежит штаммам галотолерантных бактерий, обладающих комплексом хозяйственно ценных свойств (азотфиксацией, фосфатсолубилизацией и рост-стимуляцией, обусловленной синтезом ауксина и осмопротекторов – пролина и бетаина) и способных расти в присутствии углеводов и ионов тяжелых металлов. Микробные препараты, полученные на основе природных непатогенных и нетоксичных штаммов микроорганизмов, обладают комплексом полезных свойств, эффективно размножаются в засоленной почве, экологически безопасны, не создают угрозы биогенного загрязнения и имеют пролонгированное действие [2].

Главным преимуществом метода биоремедиации почв с использованием микроорганизмов является длительность действия последних и гармонизация экосистем. В настоящее время с целью биоремедиации засоленных почв с использованием микроорганизмов активно разрабатываются микробные препараты, направленные на уменьшение негативного влияния засоления. Положительные результаты применения микробных препаратов для минимизации негативного влияния засоления на растения, по-видимому, определяются высоким природным адаптационным потенциалом растительно-микробных ассоциаций и их эволюционно закрепленным взаимовыгодным сосуществованием [3].

В связи с изложенным выше особый интерес представляет консорциум штаммов, состоящий из солеустойчивых азотфиксирующих *Rh. jostii* СА-6 и фосфатсолубилизирующих *P. megaterium* Ср-1 бактерий, растущих на среде, содержащей хлорид натрия в концентрациях 2052 и 2565 мМ соответственно, способствующих восстановлению в почве азотно-фосфорного баланса биологическим способом, что обеспечивает не только сохранность зеленых насаждений, но и улучшает их жизненное состояние и стимулирует рост [4].

Цель работы – подбор питательной среды и оптимизация условий культивирования солеустойчивых бактерий *P. megaterium* Ср-1 и *Rh. jostii* СА-6 с целью получения микробного удобрения.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлись выделенные из образцов почвы, отобранной на территории ОАО «Беларуськалий», бактериальные штаммы *P. megaterium* Ср-1 и *Rh. jostii* СА-6, способные расти на среде, содержащей 2565 мМ (15 %) и 2052 мМ (12 %) NaCl и обладающие взаимодополняющими ценными свойствами.

Способность штаммов *P. megaterium* Ср-1 и *Rh. jostii* СА-6 расти в присутствии углеводов изучали на среде Е8 [5], содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нефть, дизельное топливо, индустриальное масло, керосин, гексадекан, гексан и ксилол в концентрации 0,1 % [5].

Устойчивость исследуемых бактерий к ионам тяжелых металлов определяли на основании способности расти на агаризованной LB-среде [6], содержащей ионы тяжелых металлов ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) в концентрации 0,1–5,0 ммоль/л [7].

Оптимизацию состава питательной среды для глубинного культивирования солеустойчивых азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий проводили в лабораторных и производственных условиях. Рост отобранных штаммов исследовали на жидких питательных средах: LB, Мейнелла и модифицированной среде Мейнелла [8, 9]. Раздельное глубинное культивирование штаммов в лабораторных условиях проводили в течение 72 ч на лабораторной качалке с частотой вращения ( $200 \pm 20$ ) об/мин в колбах Эрленмейра объемом 250 мл со 100 мл изучаемой питательной среды. Количество инокулята – 10 об. %.

Отработку режимов массообмена проводили на шейкере-инкубаторе WY-211 в колбах номинальным объемом 2 л и коэффициентом заполнения питательной средой 0,5. Раздельное глубинное культивирование штаммов осуществляли на среде Мейнелла с внесением в среду инокулята в объеме 10 % от объема среды при температуре ( $28 \pm 1$ ) °С. Скорость вращения качалки – ( $140 \pm 10$ ) и ( $180 \pm 10$ ) об/мин, время культивирования – 72 ч.

Отработку технологических параметров получения микробного удобрения «Биотилия», состоящего из консорциума штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6, проводили в Научно-производственном центре биотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси. Раздельное глубинное культивирование штаммов Cp-1 и CA-6 осуществляли на ферментере Biotron SP-60 с коэффициентом заполнения 0,5. Штаммы выращивали на среде Мейнелла при следующих условиях: количество посевного материала – 5 и 10 об. %, скорость вращения мешалки –  $(70 \pm 20)$  об/мин, аэрация – 0,8–1,0 л воздуха/л среды/мин, температура –  $(30 \pm 1)$  °С, время раздельного глубинного культивирования – 48 ч.

Титр жизнеспособных клеток определяли методом Коха с последующим высевом разведений суспензии на поверхность мясо-пептонного агара [10]. Количественный учет выросших колоний проводили через 72 ч инкубирования в термостате при температуре  $(28 \pm 2)$  °С.

**Результаты и их обсуждение.** В качестве основы микробного удобрения, предназначенного для минимизации негативного влияния противогололедных реагентов на городские насаждения и улучшения роста растений в условиях засоления, использованы эффективные солеустойчивые штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1, обладающие взаимодополняющими ценными свойствами. Фосфатсолюбилизирующий *P. megaterium* Cp-1 и азотфиксирующий *Rh. jostii* CA-6 штаммы обладают ростстимулирующим действием, обусловленным синтезом индолил-3-уксусной кислоты, и синтезируют осмолиты – пролин и бетаин, что обеспечивает им устойчивость в условиях засоления почвы.

Штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 способны расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нефть и продукты ее переработки в концентрации 0,1 %. Установлено, что штамм *Rh. jostii* CA-6 характеризуется хорошим ростом на среде с нефтью, индустриальным маслом, дизельным топливом, керосином и гексадеканом. Штамм *P. megaterium* Cp-1 растет на среде с нефтью, дизельным топливом и керосином и слабо растет на среде с гексадеканом и керосином. Установлено, что исследуемые штаммы обладают устойчивостью к ионам тяжелых металлов. Выявлено, что штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 растут на среде, содержащей ионы тяжелых металлов  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  (в концентрации 5 ммоль/л),  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  (в концентрации 3 ммоль/л) и  $Cd^{2+}$  (в концентрации 0,01 ммоль/л). Штаммы *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 способны расти на среде, содержащей  $Pb^{2+}$  в концентрации 0,5 и 5 ммоль/л соответственно. Эти свойства обеспечивают им устойчивость к загрязнению городской среды углеводородами и тяжелыми металлами.

С целью подбора питательной среды для глубинного культивирования исследовали рост бактериальных штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 на различных по составу средах: LB, Мейнелла и модифицированной среде Мейнелла. Для сравнения динамики роста штаммов каждые 24 ч отбирали пробы и определяли титр жизнеспособных клеток. Показатели роста бактериальных штаммов на сравниваемых питательных средах приведены в табл. 1.

Таблица 1. Динамика численности жизнеспособных клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 при раздельном глубинном культивировании на жидких питательных средах

Table 1. Dynamics of the viable cell titer of *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 during separate submerged cultivation in liquid nutrient media

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	<i>Rh. jostii</i> CA-6	<i>P. megaterium</i> Cp-1
LB-среда		
0	$(2,61 \pm 0,037) \cdot 10^7$	$(4,63 \pm 0,141) \cdot 10^7$
24	$(1,22 \pm 0,031) \cdot 10^8$	$(4,40 \pm 0,306) \cdot 10^8$
48	$(1,61 \pm 0,098) \cdot 10^9$	$(1,07 \pm 0,033) \cdot 10^9$
72	$(4,20 \pm 0,082) \cdot 10^8$	$(3,92 \pm 0,122) \cdot 10^8$
Среда Мейнелла (3,0 мас. % мелассы)		
0	$(2,13 \pm 0,070) \cdot 10^7$	$(4,44 \pm 0,000) \cdot 10^7$
24	$(1,14 \pm 0,046) \cdot 10^8$	$(4,45 \pm 0,184) \cdot 10^8$

Окончание табл. 1

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	<i>Rh. jostii</i> СА-6	<i>P. megaterium</i> Ср-1
48	$(1,79 \pm 0,109) \cdot 10^9$	$(1,88 \pm 0,168) \cdot 10^9$
72	$(4,33 \pm 0,249) \cdot 10^8$	$(5,73 \pm 0,170) \cdot 10^8$
Модифицированная среда Мейнелла (2,0 мас. % мелассы)		
0	$(3,13 \pm 0,097) \cdot 10^7$	$(4,58 \pm 0,062) \cdot 10^7$
24	$(2,10 \pm 0,081) \cdot 10^8$	$(5,27 \pm 0,353) \cdot 10^8$
48	$(2,20 \pm 0,092) \cdot 10^9$	$(2,62 \pm 0,101) \cdot 10^9$
72	$(4,73 \pm 0,262) \cdot 10^8$	$(6,60 \pm 0,294) \cdot 10^8$

Результаты исследования свидетельствуют о пригодности различных питательных сред для получения культуральных жидкостей с титром жизнеспособных клеток не менее  $1,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. Для получения указанного титра достаточно культивировать штаммы до 48 ч, так как при дальнейшем культивировании титр клеток снижается. Более высокие титры жизнеспособных клеток получены на среде Мейнелла и модифицированной среде Мейнелла. Количество жизнеспособных клеток *Rh. jostii* СА-6 на этих средах составляло  $1,79 \cdot 10^9$  и  $2,20 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, а для *P. megaterium* Ср-1 –  $1,88 \cdot 10^9$  и  $2,62 \cdot 10^9$  КОЕ/мл соответственно. Данные среды являются наиболее технологичными и недорогими, так как в их состав входит меласса – побочный продукт свеклосахарного производства.

С целью изучения возможности интенсификации процесса раздельного глубинного культивирования *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 изменили технологию подготовки посевного материала: в испытанные на предыдущем этапе питательные среды Мейнелла и модифицированную среду Мейнелла вносили двухсуточный посевной материал *Rh. jostii* СА-6 и суточный *P. megaterium* Ср-1, а также прогретый до 60 °С в течение 20 мин посевной материал *P. megaterium* Ср-1. Более высокие титры жизнеспособных клеток биоагентов получены на среде Мейнелла при внесении односуточного посевного материала *P. megaterium* Ср-1 и двухсуточного *Rh. jostii* СА-6. Титр клеток *Rh. jostii* СА-6 при глубинном культивировании на среде Мейнелла достигал максимума ( $2,00 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) через 48 ч. На модифицированной среде Мейнелла через 96 ч роста титр достигал только  $9,70 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. При культивировании штамма *P. megaterium* Ср-1 на среде Мейнелла максимальная плотность бактериальной популяции выявлена через 48 ч глубинного выращивания ( $3,50 \cdot 10^9$  КОЕ/мл). Максимальное число спор *P. megaterium* Ср-1 отмечалось также через 48 ч роста: на среде Мейнелла –  $8,75 \cdot 10^8$  спор/мл, на модифицированной среде Мейнелла –  $9,17 \cdot 10^8$  спор/мл. При использовании для засева питательной среды Мейнелла прогретого посевного материала *P. megaterium* Ср-1 максимальный титр жизнеспособных клеток биоагента выявлен через 48 ч роста –  $1,71 \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

При раздельном глубинном культивировании исследуемых штаммов выявлено изменение pH среды (рис. 1).

При росте бактерий *Rh. jostii* СА-6 обе питательные среды подщелачиваются, однако на модифицированной среде Мейнелла подщелачивание идет интенсивнее. При культивировании *P. megaterium* Ср-1 на среде Мейнелла в течение 96 ч наблюдается подкисление среды, а на модифицированной среде Мейнелла – подщелачивание. Максимальный титр жизнеспособных клеток штаммов бактерий *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 установлен через 48 ч культивирования при pH 7,25 и 7,05 соответственно.

Исследование влияния режимов массообмена на рост штаммов *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 при глубинном культивировании осуществляли при температуре  $(28 \pm 2)$  °С на среде Мейнелла с внесенным в объеме 10 % инокулятом, используя шейкер-инкубатор WY-211 (табл. 2).

Максимальные титры жизнеспособных клеток бактерий и спор получены через 48 ч раздельного культивирования при скорости вращения шейкера  $(180 \pm 10)$  об/мин. Их значения для *Rh. jostii* СА-6 составляли  $2,3 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, для *P. megaterium* Ср-1 –  $3,1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл и  $9,93 \cdot 10^8$  спор/мл.

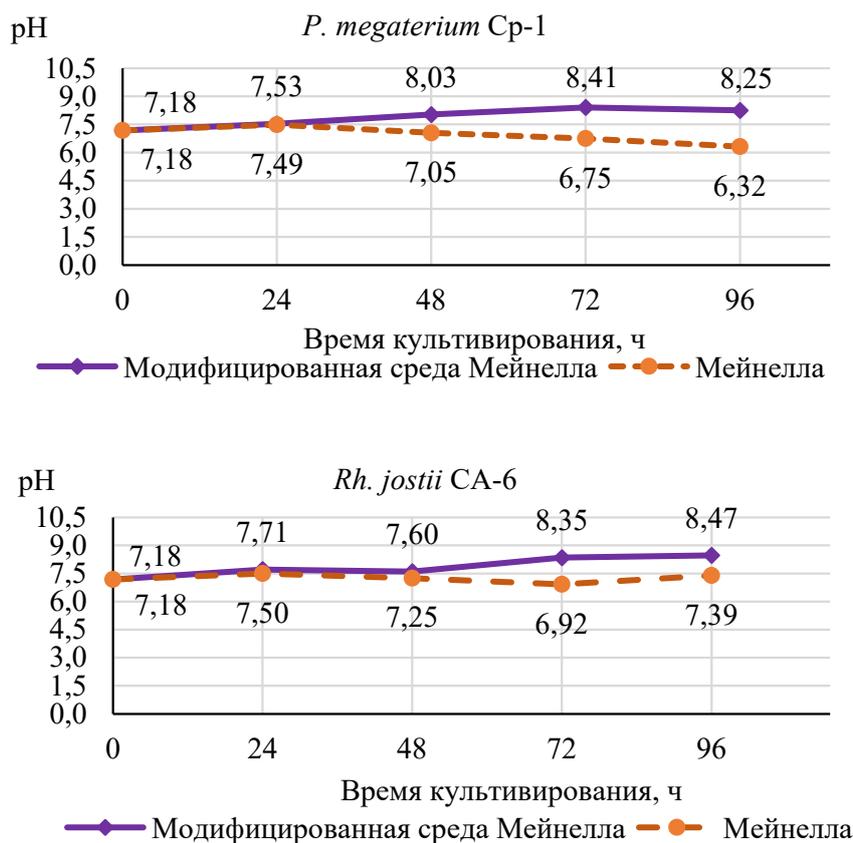


Рис. 1. Динамика изменения pH при культивировании микроорганизмов на жидких средах разного состава

Fig. 1. Dynamics of pH change during microbial culture in liquid media of different composition

Таблица 2. Динамика численности жизнеспособных клеток штаммов *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 при разных режимах массообмена в условиях глубинного культивирования

Table 2. Dynamics of a number of viable cells of the strains *P. megaterium* Cp-1 and *Rh. jostii* CA-6 under different mass transfer modes in submerged culture

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	<i>Rh. jostii</i> CA-6	<i>P. megaterium</i> Cp-1
140 об/мин		
0	$(3,72 \pm 0,321) \cdot 10^7$	$(2,00 \pm 0,192) \cdot 10^7$
24	$(5,13 \pm 0,075) \cdot 10^8$	$(1,31 \pm 0,092) \cdot 10^8$
48	$(1,07 \pm 0,065) \cdot 10^9$	$(2,88 \pm 0,024) \cdot 10^9$
72	$(5,47 \pm 0,475) \cdot 10^8$	$(1,15 \pm 0,024) \cdot 10^8$
180 об/мин		
0	$(3,72 \pm 0,321) \cdot 10^7$	$(2,00 \pm 0,192) \cdot 10^7$
24	$(6,33 \pm 0,358) \cdot 10^8$	$(1,50 \pm 0,023) \cdot 10^8$
48	$(2,30 \pm 0,673) \cdot 10^9$	$(3,10 \pm 0,140) \cdot 10^9$
72	$(5,87 \pm 0,067) \cdot 10^8$	$(5,85 \pm 0,140) \cdot 10^8$

Таким образом, оптимальной средой для роста и развития *P. megaterium* Cp-1 и *Rh. jostii* CA-6 является среда Мейнелла, содержащая в качестве источника углерода побочный продукт сахарного производства мелассу в количестве 30 г/л. Для засева питательной среды продуктивным оказалось использование двухсуточного посевного материала *Rh. jostii* CA-6 и односуточного *P. megaterium* Cp-1 при скорости вращения шейкера  $(180 \pm 10)$  об/мин.

С целью масштабирования процесса культивирования исследовали рост штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 в производственных условиях на среде Мейнелла при использовании 5 и 10 % посевного материала (скорость вращения мешалки –  $(70 \pm 20)$  об/мин, аэрация – 1,0 л воздуха/л среды/мин, температура –  $(28 \pm 2)$  °С. Результаты раздельного глубинного культивирования исследуемых штаммов представлены в табл. 3.

Таблица 3. Динамика развития популяции жизнеспособных клеток штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1 при раздельном глубинном культивировании в ферментере Biotron SP-60

Table 3. Dynamics of development of the viable cell population of *Rh. jostii* CA-6 and *P. megaterium* Cp-1 during separate submerged cultivation in a Biotron SP-60 fermenter

Время культивирования, ч	Титр жизнеспособных клеток, КОЕ/мл	
	Кол-во инокулята 5 об. %	Кол-во инокулята 10 об. %
<i>P. megaterium</i> Cp-1		
0	$(1,93 \pm 0,167) \cdot 10^7$	$(4,85 \pm 0,093) \cdot 10^7$
24	$(4,60 \pm 0,020) \cdot 10^8$	$(6,53 \pm 0,263) \cdot 10^8$
48	$(6,37 \pm 0,087) \cdot 10^8$	$(2,21 \pm 0,047) \cdot 10^9$
<i>Rh. jostii</i> CA-6		
0	$(9,42 \pm 0,012) \cdot 10^6$	$(3,57 \pm 0,0708) \cdot 10^7$
24	$(4,96 \pm 0,058) \cdot 10^7$	$(4,99 \pm 0,179) \cdot 10^8$
48	$(1,03 \pm 0,004) \cdot 10^9$	$(3,18 \pm 0,042) \cdot 10^9$

При раздельном глубинном культивировании исследуемых штаммов было выявлено, что через 48 ч раздельного глубинного роста титр жизнеспособных клеток *P. megaterium* Cp-1 на среде Мейнелла при внесении 10 % посевного материала составил  $2,21 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, а для штамма *Rh. jostii* CA-6 –  $3,18 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. Максимальный титр жизнеспособных клеток Cp-1 ( $(2,23 \pm 0,012) \cdot 10^9$  КОЕ/мл) получен через 36 ч раздельного глубинного культивирования бактерий при внесении 5 % посевного материала. При глубинном культивировании штамма *Rh. jostii* CA-6 в условиях внесения 5 % посевного материала титр жизнеспособных клеток через 48 ч составлял  $(1,03 \pm 0,004) \cdot 10^9$  КОЕ/мл.

Таким образом, для получения микробного удобрения с титром не менее  $1,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл в производственных условиях наиболее технологичным будет использование посевного материала в количестве 5 % от объема среды культивирования.

В процессе глубинного культивирования фосфатсольюбилизирующего штамма *P. megaterium* Cp-1 с 4-го по 16-й час выращивания идет подкисление среды, что свидетельствует об образовании кислых метаболитов, а затем отмечается увеличение показателя pH (его значение приближается к исходному). При глубинном культивировании азотфиксирующего штамма *Rh. jostii* CA-6 значения pH среды более стабильны (рис. 2).

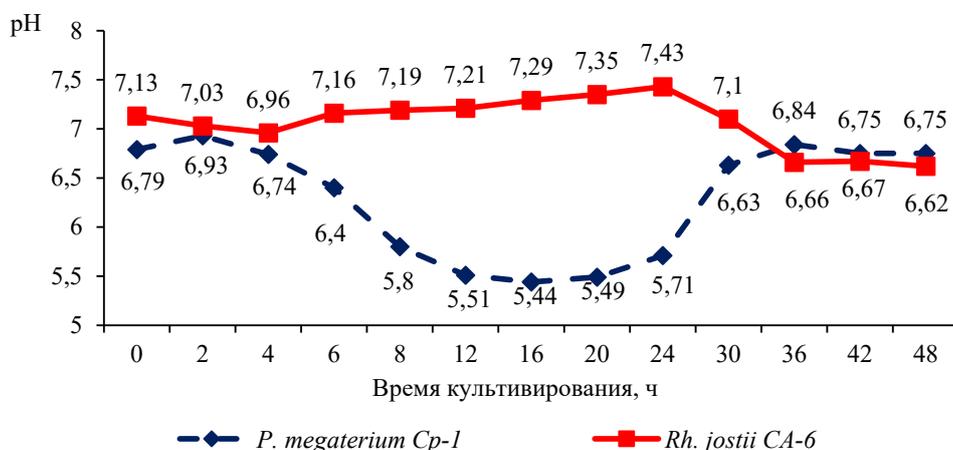


Рис. 2. Значения pH среды при раздельном глубинном культивировании штаммов *Rh. jostii* CA-6 и *P. megaterium* Cp-1

Fig. 2. The pH values of the medium during separate submerged cultivation of *Rh. jostii* CA-6 and *P. megaterium* Cp-1

С целью получения микробного удобрения культуральные жидкости отдельно выращенных солеустойчивых ростстимулирующих азотфиксирующего *Rh. jostii* СА-6 и фосфатсолубилизирующего *P. megaterium* Ср-1 штаммов смешивают в соотношении 1:1. Изучение сохранности жизнеспособных клеток в микробном удобрении при температуре от +4 до +15 °С в течение 3 мес. показало, что исходный титр жизнеспособных бактериальных клеток, составляющий  $5,37 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, через 3 мес. хранения при температуре от +4 до +15 °С снижается до  $2,2 \cdot 10^9$  и  $1,67 \cdot 10^9$  КОЕ/мл соответственно, что соответствует техническим условиям.

Данные, полученные в ходе отработки параметров культивирования штаммов *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 в производственных условиях, использованы для разработки технологии получения микробного удобрения «Биотилия», предназначенного для минимизации негативного влияния противогололедных реагентов на городские насаждения и улучшения роста растений в условиях засоления [11].

**Заключение.** Солеустойчивые фосфатсолубилизирующий *P. megaterium* Ср-1 и азотфиксирующий *Rh. jostii* СА-6 штаммы обладают ростстимулирующим действием, обусловленным синтезом индолил-3-уксусной кислоты, а также синтезируют осмолиты – пролин и бетаин, что обеспечивает им устойчивость в условиях засоления почвы хлоридом натрия. Наличие деструктивных свойств, обусловленных способностью расти на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нефть и продукты ее переработки в концентрации 0,1 %, и устойчивости к ионам тяжелых металлов в концентрации 0,1–5,0 ммоль/л обеспечивает этим штаммам жизнеспособность в условиях загрязнения почвы углеводородами и тяжелыми металлами.

Оптимальной средой для роста и развития штаммов *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1 является среда Мейнелла, содержащая в качестве источника углерода побочный продукт свеклосахарного производства мелассу в количестве 30 г/л. Использование для засева питательной среды двухсуточного посевного материала *Rh. jostii* СА-6 и односуточного *P. megaterium* Ср-1 при скорости вращения шейкера ( $180 \pm 10$ ) об/мин является наиболее продуктивным. С целью получения титра штаммов-биоагентов не менее  $1,0 \cdot 10^9$  КОЕ/мл при глубинном культивировании наиболее технологичным является использование посевного материала в количестве 5 % от объема среды.

Раздельно культивируемые штаммы *Rh. jostii* СА-6 и *P. megaterium* Ср-1, составляющие основу микробного удобрения «Биотилия», при смешивании 1:1 сохраняют свою жизнеспособность на высоком и экологически значимом уровне ( $1,67$ – $2,2 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) через 3 мес. хранения при температуре от +4 до +15 °С.

### Список использованных источников

1. Дорохова, М. Ф. Экологическое состояние городских почв в условиях антропогенного засоления и загрязнения (на примере Северо-Западного округа Москвы) / М. Ф. Дорохова, Н. Е. Кошелева, Е. В. Терская // Теор. и приклад. экология. – 2015. – № 4. – С. 16–34.
2. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants : a review / D. M. Ha-Tran [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, N 6. – Art. 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
3. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants / H. Verma [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9, N 8. – Art. 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
4. Выделение и идентификация микроорганизмов, устойчивых к засолению почв / Н. И. Наумович [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 54–65.
5. Омирбекова, А. А. Изучение углеводородокисляющих микроорганизмов ризосферы и ризопланы растений : дис. ... д-ра биол. наук : 6D060700 / А. А. Омирбекова ; Казах. нац. ун-т имени аль-Фараби. – Алматы, 2015. – 128 с.
6. 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. Скрябина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
7. Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent / E. E. Oaikhena [et al.] // Am. J. Environ. Protect. – 2016. – Vol. 5, N 2. – P. 29–34. <https://doi.org/10.11648/j.ajep.20160502.12>
8. Мейнелл, Дж. Экспериментальная микробиология / Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. – М. : Мир, 1967. – С. 320.
9. Нагорный, Р. К. Технология получения и применения микробного препарата «Тэамин» для очистки абсорбционных растворов от третичных аминов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Р. К. Нагорный ; НАН Беларусі, ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларусі». – Минск, 2018. – 25 с.
10. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям и контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2002. – 100 с.
11. Влияние микробного удобрения «Биотилия» на микробиом городских почв и жизненное состояние каштана конского в условиях засоления / Г. В. Сафронова [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларусі [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 13. – С. 359–379.

## References

1. Dorokhova M. F., Kosheleva N. E., Terskaya E. V. Ecological state of urban soils subject to anthropogenic salinization and pollution (the North-Western District of Moscow as a study case). *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya* [Theoretical and applied ecology], 2015, no. 4, pp. 16–34 (in Russian).
2. Ha-Tran D. M., Nguyen T., Hung S. H., Huang E., Huang C. C. Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 6, art. 3154. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
3. Verma H., Kumar D., Kumar V., Kumari M., Singh S. K., Sharma V. K., Droby S., Santoyo G., White J. F., Kumar A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, 8, art. 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
4. Naumovich N. I., Aleshchenkova Z. M., Anan'eva I. N., Safronova G. 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).
5. Omirbekova A. A. *Study of hydrocarbon-oxidizing microorganisms of the rhizosphere and rhizoplane of plants*. Ph. D. diss. Almaty, 2015. 128 p. (in Russian).
6. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Moscow, Mir Publ., 1984. 479 p. (in Russian).
7. Oaikhena E. E., Makaije D. B., Denwe S. D., Namadi M. M., Haroun A. A. Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent. *American Journal of Environmental Protection*, 2016, vol. 5, no. 2, pp. 29–34. <https://doi.org/10.3390/ijms22063154>
8. Meynell G. G., Meynel E. *Experimental microbiology*. Moscow, Mir Publ., 1967. 320 p. (in Russian).
9. Nagorny R. K. *Technologies of production and application of microbial preparation "Teamine" for disposal of tertiary amines in absorption solutions*. Ph. D. diss. Minsk, 2018. 25 p. (in Russian).
10. Lysak V. V., Zheldakova R. A. *Microbiology: manual for laboratory classes and control of students' independent work*. Minsk, Belarusian State University, 2002. 100 p. (in Russian).
11. Safronova G. V., Anan'eva I. N., Aleshchenkova Z. M., Naumovich N. I., Yakovlev A. P., Nikolaichuk A. M., Vashkevich, M. N. Effect of microbial fertilizer "Biotilia" on urban soil microbiome and the vitality of horse chestnut exposed to salinization. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 13* [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works. Vol. 13]. Minsk, 2021, pp. 359–379 (in Russian).

## Информация об авторах

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

Алещенко 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](mailto: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: [ananjeva@mbio.bas-net.by](mailto:ananjeva@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](mailto:hsafronava@mail.ru)

## Information about the authors

Nadezhda I. Naumovich – 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](mailto: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](mailto: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: [ananjeva@mbio.bas-net.by](mailto:ananjeva@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](mailto:hsafronava@mail.ru)

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 528.94: 621.396.33:528.8: 581.5

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-293-303>

Поступила в редакцию 21.04.2022

Received 21.04.2022

**Д. Г. Груммо, А. В. Пугачевский, С. Г. Русецкий, Н. А. Зеленкевич**

*Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь*

## **АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ЛЕСНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПОКРОВА БЕЛАРУСИ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ДИСТАНЦИОННОГО ЗОНДИРОВАНИЯ**

**Аннотация.** В работе на основе интеграции спутниковых картографических продуктов, данных дистанционного зондирования проведен анализ динамики лесного растительного покрова Беларуси. Установлено, что стабильный лесной покров в настоящее время занимает 7209,0 тыс. га (75,8 %), а сформированный на ранее нелесных землях – 1459,5 тыс. га (14,7 %). За период с 1985 по 2020 г. потери лесов составили 1569,3 тыс. га. За период с 2016 по 2020 г. среднегодовая площадь обезлесения составила 83,4 тыс. га в год, что в 2,3 раза выше по отношению к средним показателям за 1985–2015 гг. Наибольшие потери лесов отмечались в 2016–2018 гг. По сравнению с данными Национального статистического комитета за 2020 г. разница с фактической площадью покрытых лесом земель составила 664,9 тыс. га (расхождение 7,4 %). По данным дистанционного зондирования, площадь лесопокрытых земель оценивается в 8999,3 тыс. га, что соответствует 43,3 % лесистости.

Предложенный подход к анализу изменений лесного растительного покрова – качественное и экономически выгодное информационное обеспечение для принятия управленческих решений по использованию лесных ресурсов на основе данных дистанционного зондирования.

**Ключевые слова:** спутниковые картографические продукты, геоботаническая карта, ArcGIS, леса, лесистость, потеря лесов

**Для цитирования:** Анализ динамики лесного растительного покрова Беларуси на основе данных дистанционного зондирования / Д. Г. Груммо [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 293–303. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-293-303>

**Dzmitry G. Grummo, Alexander V. Pugachevsky, Siarhei G. Rusetsky, Natallia A. Zeliankevich**

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

## **ANALYSIS OF FOREST COVER DYNAMICS IN BELARUS BASED ON REMOTE SENSING DATA**

**Abstract.** An analysis of the forest vegetation cover dynamics in Belarus based on the integration of satellite cartographic products and remote sensing data is presented in the article. Currently, the stable forest cover occupies 7209.0 thousand hectares (75.8 %); the forests formed on the previously non-forest lands – 1459.5 thousand hectares (14.7 %). The loss of forests amounted to 1569.3 thousand hectares for the period 1985–2020. For the period 2016–2020, the average annual deforestation area was 83.4 thousand ha/year, or 2.3 times higher than the average one for 1985–2015. The largest forest loss areas were in 2016–2018. Compared to the data of the National Statistical Committee for 2020, the difference with the actual area of the forest-covered land was 664.9 thousand hectares (7.4 % discrepancy). The area of the forested land according to the remote sensing data is 8999.3 thousand hectares, the forest cover is 43.3 %.

The proposed approach to analyzing the forest vegetation changes based on remote sensing data is a high-quality and cost-effective information support for managerial decisions on the forest use.

**Keywords:** satellite maps, geobotanical map, ArcGIS, forests, forest cover, deforestation

**For citation:** Grummo Dz. G., Pugachevsky A. V., Rusetsky S. G., Zeliankevich N. A. Analysis of forest cover dynamics in Belarus based on remote sensing data. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 293–303 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-293-303>

**Введение.** Интенсификация аграрного производства, сопровождаемая сокращением площадей сельскохозяйственных земель, изменение подходов к организации и ведению лесного хозяйства, увеличение роли лесопромышленного комплекса в национальной экономике и другие социально-экономические причины вызвали существенные изменения лесного растительного покрова Беларуси за последние десятилетия.

Цель данных исследований – проследить за изменениями лесного растительного покрова с 1985 по 2020 г. в Республике Беларусь.

Открытые каталоги спутниковых данных, в частности собираемых с помощью программы Landsat с середины 1980-х годов по настоящее время, позволяют провести независимую оценку динамики растительного покрова, исследовать изменения категорий землепользования, а также пространственного распределения лесных ресурсов [1–3].

**Методы исследований.** В основу картографической оценки динамики лесного растительного покрова Беларуси легли материалы дистанционного зондирования Земли лесов Восточной Европы за 1985–2012 гг., размещенные в открытом доступе [4]. Авторами разработан оригинальный алгоритм (рис. 1) обработки снимков и создания временных серий изображений, который позволяет картографировать общую лесопокрытую площадь, ее потери и увеличение [3, 5]. Оценка точности тематического продукта (точность производителя) для выделенных авторами категорий динамики лесного растительного покрова составила (в %): сокращение лесного покрова 1985–2000 гг. – 90,0; сокращение лесного покрова 2000–2012 гг. – 88,2; восстановление лесного покрова (после сокращения 1985–2012 гг.) – 96,9; восстановление лесного покрова (внутри нелесных территорий 1985 г.) – 75,2 [3].

Результаты картографирования динамики лесного покрова дополнены нами данными за период с 2013 по 2020 г. (рис. 2). Исследования выполнены с использованием метода построения и обработки сезонных безоблачных композитных изображений [3, 6–8]. Модель была обучена

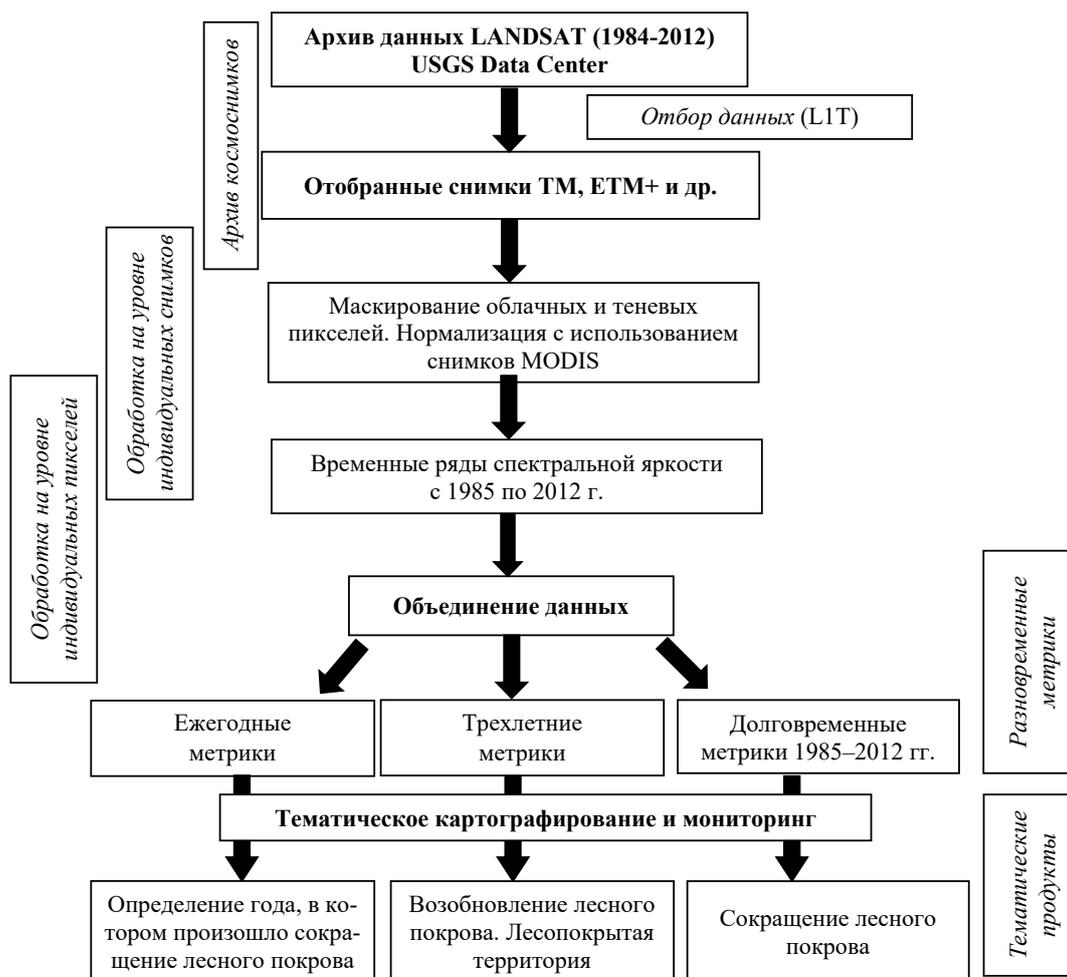


Рис. 1. Общая технологическая схема картографирования динамики лесного растительного покрова по спутниковым данным Landsat [3]

Fig. 1. General technological mapping scheme of forest vegetation dynamics using the Landsat satellite data [3]



Рис. 2. Алгоритм изучения динамики лесного растительного покрова Беларуси по данным дистанционного зондирования с 1985 по 2020 г.

Fig. 2. Study algorithm of forest vegetation cover dynamics in Belarus based on remote sensing data from 1985 to 2020

с использованием продукта оценки сомкнутости крон деревьев. Порог сомкнутости крон использовался ранее для картографирования лесопокрытой площади и был рассчитан с учетом наилучшего соответствия полученной площади результатам официального лесного учета [5, 9]. Пиксели с сомкнутостью крон  $>49\%$  были отнесены к лесопокрытым, а с сомкнутостью крон  $\leq 49\%$  – к не покрытым лесом площадям [3]. Метод классификации с обучением применялся для картографирования нарушений лесного покрова. Для определения года изменений использовали временные ряды изменения вегетационного индекса NDVI, построенные на основе ежегодных метрик [3]. Возобновление лесного покрова определяли по сравнению с состоянием на 2012 г. [3, 5]. В ходе проведения исследований использовали сервис платформы облачных вычислений Google Earth Engine. Анализ полученных данных осуществляли также с применением специальных тематических продуктов (Global PALSAR-2/PALSAR Forest/Non-Forest Map [10], Hansen Global Forest Change [11, 12], MCD64A1 [13]).

В результате синтеза разнообразной аналитической информации на платформе ArcGIS были составлены (рис. 2) крупномасштабные (М 1:100 000) карты динамики лесного покрова Беларуси за 1985–2020 гг. (рис. 3); потери лесов Беларуси за 1985–2020 гг.; древесно-кустарниковой растительности (ДКР), не включенной в состав Гослесфонда (рис. 4).

При оценке нарушения лесного покрова не проводилось разделение по типу (гари, ветровалы, вырубki, сплошные санитарные рубки в очагах повреждения насекомыми, вымочки, сведение лесов для нужд экономики и т. д.).

Составленные цифровые карты могут обновляться в интерактивном режиме, а алгоритм позволяет строить оперативные аналитические карты динамического состояния лесного покрова. Тематический картографический продукт легко увязывается с другими материалами (лесоустроительными данными, границами особо охраняемых природных территорий, административных районов, водоохранных зон и т. д.), что позволяет создавать разнообразные тематические карты и анализировать их в различных сочетаниях для оценки структуры, состояния и динамики лесов (рис. 5, табл. 1–4).

**Результаты и их обсуждение.** Анализируя материалы исследований (см. табл. 1–4, рис. 3–5), следует отметить, что стабильный лесной покров (с сохранением структуры, без признаков повреждения и деградации) в настоящее время занимает 7209,0 тыс. га (75,8 %), а сформированный на ранее (с 1985 г.) нелесных землях – 1459,5 тыс. га (14,7 %).

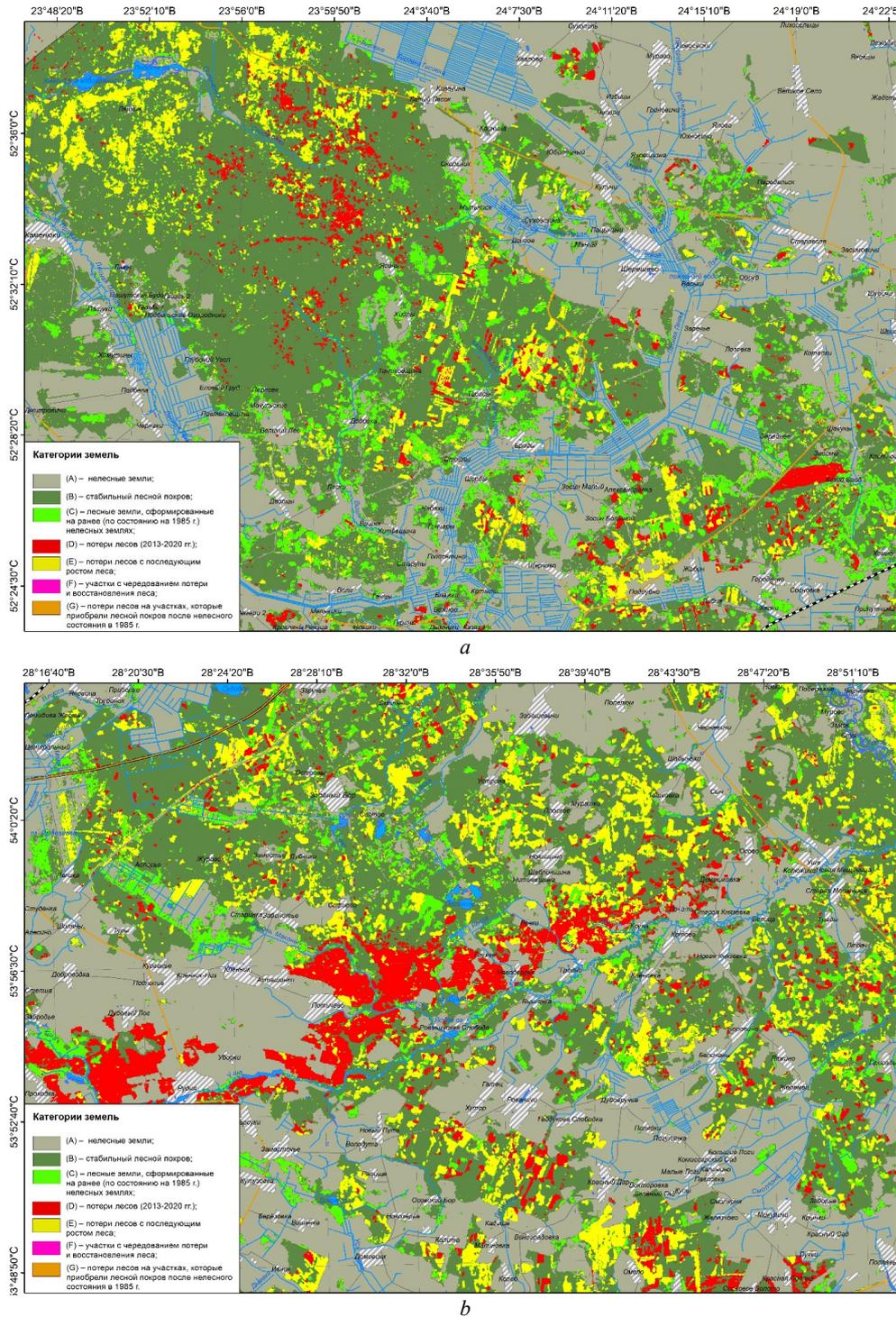


Рис. 3. Фрагменты цифровой карты изменения лесного покрова Беларуси за период с 1985 по 2020 г. (*a* – Пружанский район Брестской области (Национальный парк «Беловежская пушча»), *b* – Смолевичский район Минской области)

Fig. 3. Digital map fragments of the forest cover changes in Belarus from 1985 to 2020 (*a* – Pruzhany district of Brest region (National Park “Belovezhskaya Pushcha”), *b* – Smolevichi district of Minsk region)

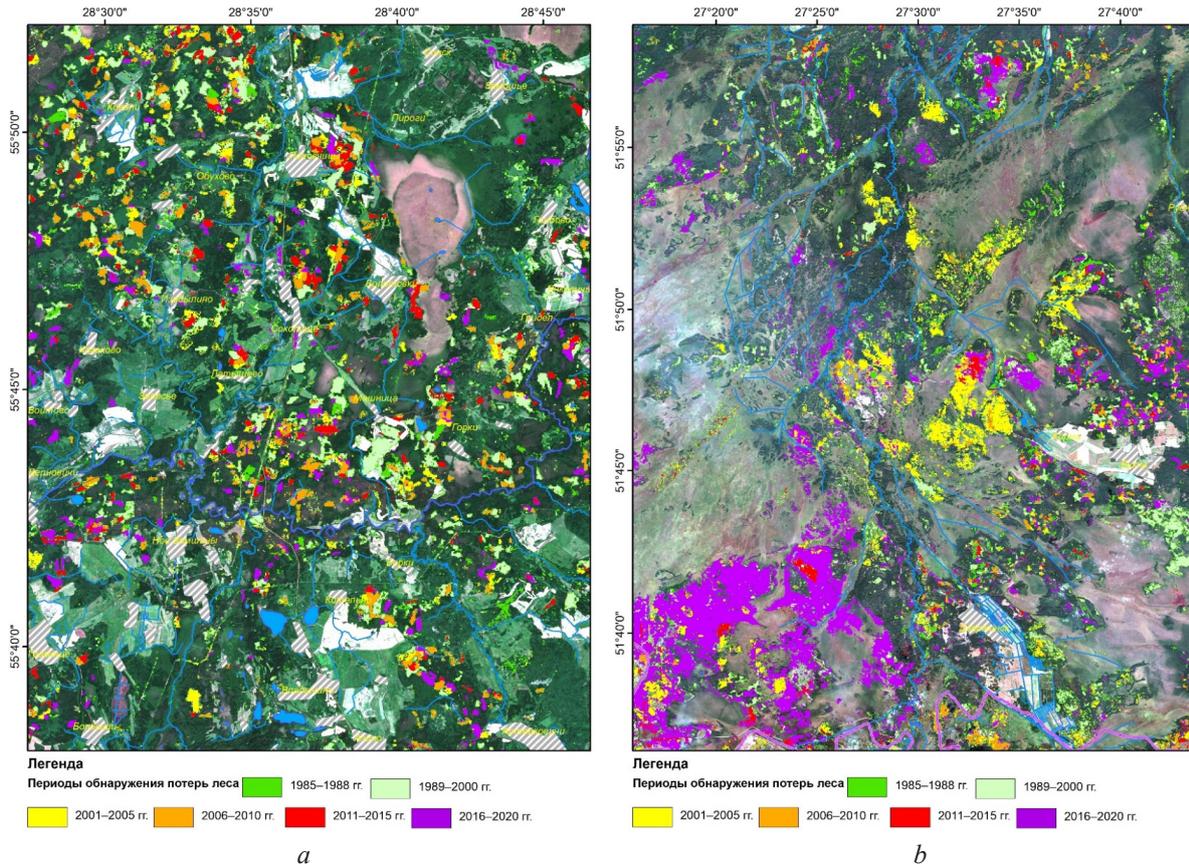


Рис. 4. Фрагменты цифровой карты потери лесов Беларуси за период с 2001 по 2020 г. (*a* – Россонский район Витебской области, *b* – Столинский район Брестской области)

Fig. 4. Digital map fragments of the forest loss in Belarus from 2001 to 2020 (*a* – Rossony district, Vitebsk region, *b* – Stolyn district, Brest region)

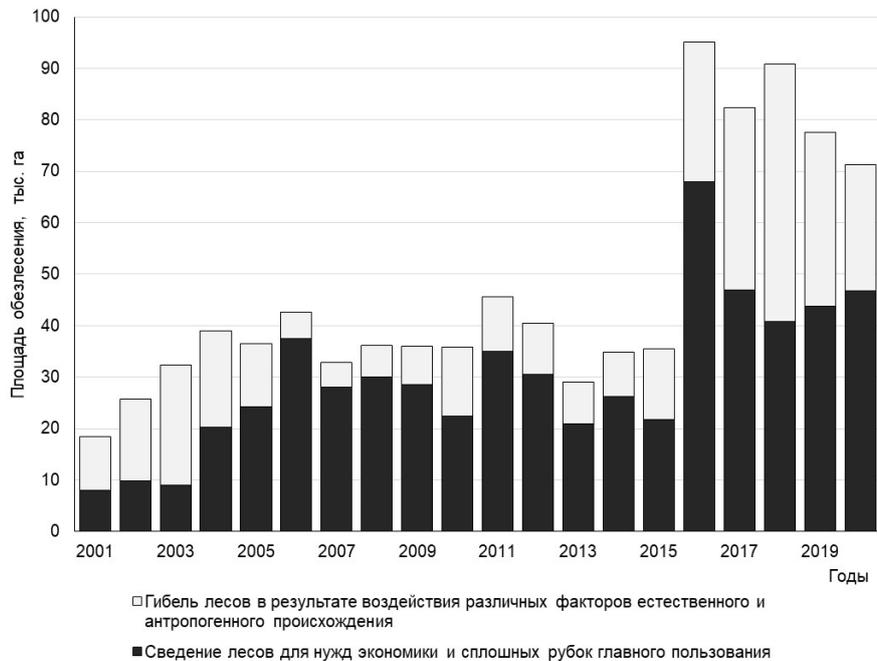


Рис. 5. Погодичная динамика потери лесов на территории Беларуси в результате воздействия всех факторов естественного и антропогенного характера

Fig. 5. Semi-annual dynamics of the forest loss in Belarus as a result of all factors of natural and anthropogenic impact

Зафиксированные с использованием спутниковой съемки потери лесов в 2013–2020 гг. (в результате ветровалов, сплошных рубок, пожаров и других неблагоприятных воздействий естественного и антропогенного происхождения) составили 516,5 тыс. га (5,2 %); потери лесов с последующим восстановлением лесного покрова (посадки лесных культур, естественное лесозаращивание) – 421,63 тыс. га (4,5 %). На незначительной (<0,1 %) площади лесного фонда выявлены участки, на которых за рассматриваемый период наблюдалось чередование гибели и прироста леса, а также отмечались потери лесов на участках, которые приобрели лесной покров после «безлесного состояния» в 1985 г. (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Динамика лесного покрова Беларуси за период с 1985 по 2020 г. (составлено с использованием данных [4] с дополнениями и уточнениями)

Table 1. Forest cover dynamics in Belarus from 1985 to 2020 (compiled by [4] supplemented and specified)

Категория участка	Площадь	
	тыс. га	%
Стабильный лесной покров	7535,8	75,8
Леса, сформированные на ранее не покрытых лесом землях (по состоянию на 1985 г.)	1459,5	14,7
Потери лесов последних лет (2013–2020 гг.)	516,5	5,2
Потери лесов с последующим восстановлением леса	421,6	4,2
Участки лесного фонда с чередованием потери и восстановления леса	4,0	0,1
Потери лесов на участках, которые приобрели лесной покров после нелесного состояния в 1985 г.	2,0	<0,1
Всего	9939,4	100

По административным областям Беларуси распределение лесных земель по категориям динамики находится в близком диапазоне (табл. 2): стабильный лесной покров занимает от 72,8 % (Минская область) до 78,1 % (Могилевская и Витебская области); леса, сформированные на ранее нелесных землях (по состоянию на 1985 г.) – от 12,2 % (Витебская область) до 16,5 % (Гомельская область); потери лесов последних лет (2013–2020 гг.) – от 3,1 % (Могилевская область) до 8,2 % (Минская область); потери лесов с последующим его восстановлением – от 2,7 % (Гомельская область) до 5,7 % (Гродненская область).

Т а б л и ц а 2. Динамика лесного покрова за период с 1985 по 2020 г. в разрезе административных областей Беларуси (составлено с использованием данных [4] с дополнениями и уточнениями)

Table 2. Forest cover dynamics in Belarus from 1985 to 2020 by the administrative regions of Belarus (compiled by [4] supplemented and specified)

Категория земель	Административная область					
	Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минская	Могилевская
Стабильный лесной покров, тыс. га (%)	1092,6 (74,4)	1608,8 (78,1)	1632,5 (77,3)	807,6 (73,5)	1391,6 (72,8)	1002,7 (78,1)
Леса, сформированные на ранее не покрытых лесом землях (по состоянию на 1985 г.), тыс. га (%)	233,8 (15,9)	251,9 (12,2)	349,6 (16,5)	156,8 (14,3)	270,5 (14,1)	196,9 (15,3)
Потери лесов последних лет (2013–2020 гг.), тыс. га (%)	65,3 (4,4)	105,1 (5,1)	75,4 (3,6)	75,1 (6,8)	156,2 (8,2)	39,3 (3,1)
Потери лесов с последующим восстановлением леса, тыс. га (%)	76,7 (5,2)	95,5 (4,6)	53,8 (2,6)	59,3 (5,4)	91,7 (4,8)	44,6 (3,5)
Участки лесного фонда с чередованием потери и восстановления леса, тыс. га (%)	0,8 (0,1)	0,5 (<0,1)	0,9 (<0,1)	0,4 (<0,1)	0,9 (0,1)	0,5 (<0,1)
Потери лесов на участках, которые приобрели лесной покров на ранее не покрытых лесом землях (1985 г.), тыс. га (%)	0,5 (<0,1)	0,2 (<0,1)	0,4 (<0,1)	0,3 (<0,1)	0,5 (<0,1)	0,2 (<0,1)

При анализе картографических данных (табл. 3, рис. 4) установлено, что за период с 1985 по 2020 г. в результате различных факторов воздействия естественного и антропогенного происхождения (рубки леса, пожары, повреждение вредителями и т. д.) потери лесов составили 1569,3 тыс. га. До 2016 г. площадь обезлесения составляла в среднем 36,2 тыс. га в год. В последние годы (2016–2020) отмечается существенный рост этого показателя. В этот период среднегодовая площадь обезлесения составила 83,4 тыс. га в год, что в 2,3 раза выше по сравнению со средними показателями за период с 1985 по 2015 г. Наибольшие площади потери лесов в Беларуси отмечались в 2016–2018 гг. (см. табл. 3).

Таблица 3. Потери лесов на территории Беларуси по различным периодам (составлено по данным [4] и собственных исследований)

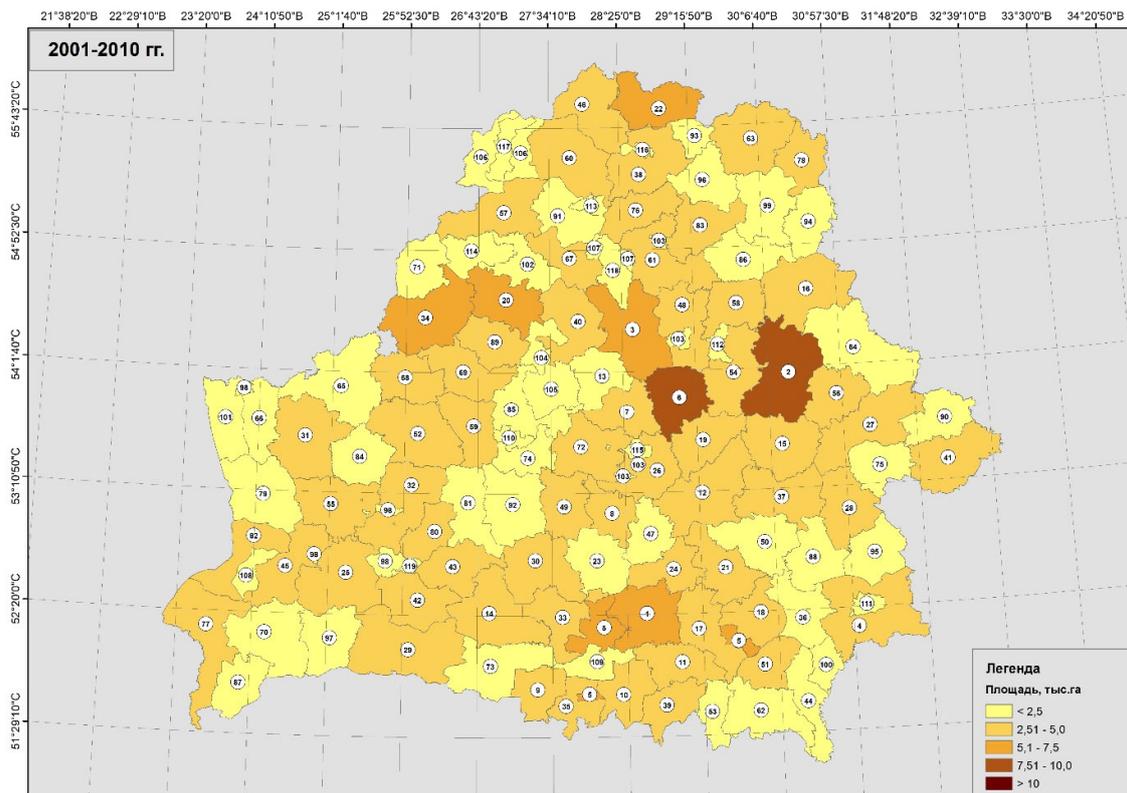
Table 3. Forests loss in Belarus in different periods (compiled by [4] and own research)

Период	Общая площадь потери лесов за указанный период, тыс. га	Среднегодовые площади потери лесов за указанный период, тыс. га в год
1986–1988	145,2	36,3
1989–2000	486,1	40,5
2001–2005	152,0	30,4
2006–2010	183,5	36,7
2011–2015	185,5	37,1
2016–2020	417,0	83,4

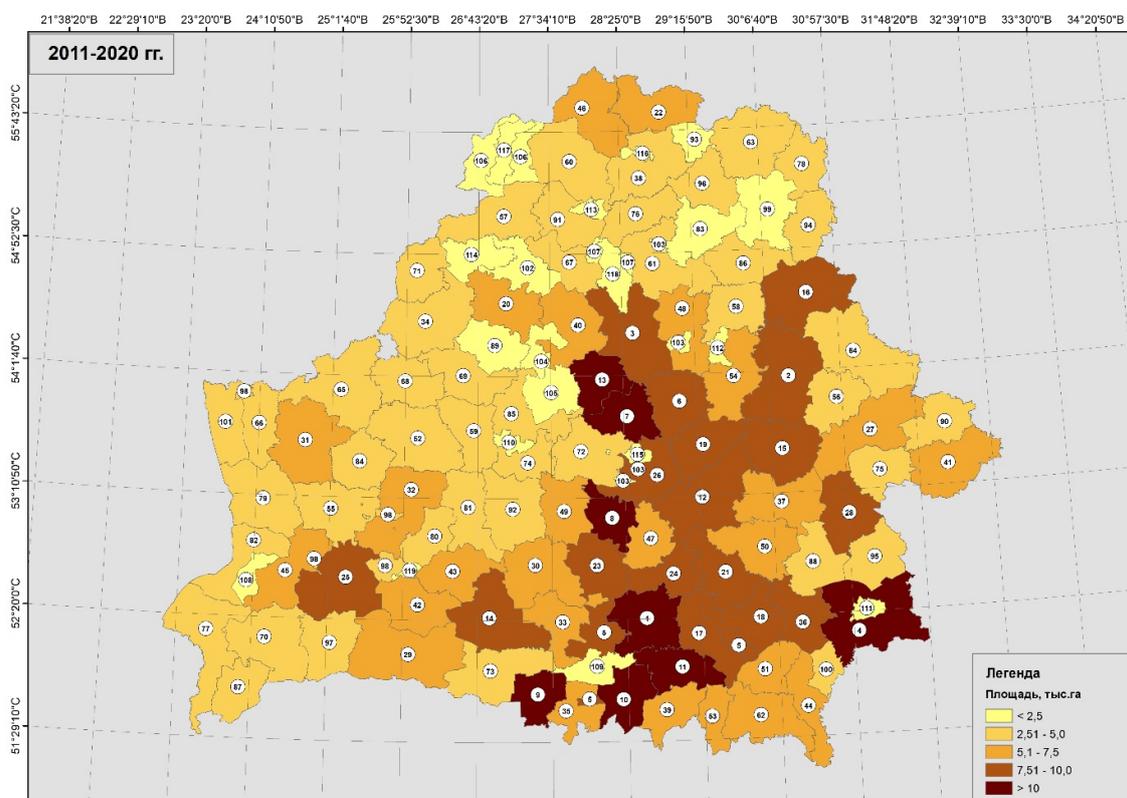
Таблица 4. Динамика потери лесов по административным областям Беларуси в 2001–2020 гг., тыс. га

Table 4. Forest loss dynamics in Belarus by the administrative regions from 2001 to 2020, thousand ha

Годы	Площади потери лесов, тыс. га						
	Витебская обл.	Минская обл.	Брестская обл.	Могилевская обл.	Гомельская обл.	Гродненская обл.	Беларусь
2001	3,61	3,90	2,88	2,15	4,01	1,99	18,54
2002	5,70	6,29	2,98	3,25	5,07	2,36	25,65
2003	6,28	6,57	4,22	4,02	8,66	2,62	32,37
2004	6,65	7,86	5,28	6,35	9,46	3,29	38,89
2005	8,47	6,99	4,80	5,56	5,53	5,16	36,51
2006	8,30	11,12	5,65	5,42	8,27	3,86	42,62
2007	5,60	6,76	5,87	3,40	7,14	4,14	32,91
2008	7,38	8,16	3,98	5,88	8,33	2,41	36,14
2009	6,47	8,57	3,83	6,47	7,53	3,14	36,01
2010	5,70	8,72	4,97	3,86	7,97	4,71	35,93
2011	6,32	11,42	4,05	7,21	11,61	5,01	45,62
2012	6,22	9,12	5,31	5,71	8,16	5,92	40,44
2013	5,82	5,97	2,93	5,28	6,19	2,90	29,09
2014	6,48	6,65	3,93	6,11	8,41	3,28	34,86
2015	6,14	6,05	3,63	6,26	10,41	3,01	35,50
2016	11,12	23,93	16,31	16,31	20,33	7,13	95,13
2017	8,32	19,20	12,52	9,21	27,62	5,41	82,28
2018	8,33	15,28	11,99	11,32	39,31	4,56	90,79
2019	9,86	14,36	13,20	10,92	23,02	6,28	77,64
2020	9,23	13,63	10,86	9,73	20,95	6,76	71,16
2001–2020	<b>142,0</b> <b>(15,1 %)</b>	<b>200,55</b> <b>(21,4 %)</b>	<b>129,19</b> <b>(13,8 %)</b>	<b>134,42</b> <b>(14,3 %)</b>	<b>247,98</b> <b>(26,4 %)</b>	<b>83,94</b> <b>(9,0 %)</b>	<b>938,08</b> <b>(100,0 %)</b>



*a*



*b*

Рис. 6. Потери лесов за 2001–2010 гг. (а) и 2011–2020 гг. (б) по лесопользователям  
Fig. 6. Forest loss for 2001–2010 (a) and 2011–2020 (b) (distribution by forestry enterprises)

Гибель насаждений (от повреждения дикими животными, болезни лесов, воздействия неблагоприятных погодных условий, излишней влажности, лесных пожаров и т. д.) за период с 2001 по 2020 г. составляет в среднем 35,8 % от общей площади обезлесения (пределы – от 12 до 72 %) (рис. 5).

Обезлесение в 2001–2020 гг. в разрезе административных областей составили: для Гомельской области – 247,98 тыс. га (26,4 % от общей площади за указанный период в Беларуси), для Минской – 200,55 тыс. га (21,4 %), для Витебской – 142 тыс. га (15,1 %), для Могилевской – 134,42 тыс. га (14,3 %), для Брестской – 129,19 тыс. га (13,8 %), для Гродненской – 89,94 тыс. га (9,0 %) (см. табл. 2). Оценка потери лесов в 2001–2020 гг., по лесопользователям исходя из данных дистанционного зондирования представлена на рис. 6. Наибольшие значения за анализируемый период отмечены для ГЛХУ «Петриковский лесхоз» (17,91 тыс. га), ГЛХУ «Могилевский лесхоз» (17,56 тыс. га), ГОЛХУ «Борисовский опытный лесхоз» (17,01 тыс. га), ГОЛХУ «Гомельский опытный лесхоз» (16,37 тыс. га), ЭЛОХ «Лясковичи» (15,63 тыс. га).

Следует отметить, что материалы оценки дистанционного зондирования расходятся с официальными данными о площади лесов в Республике Беларусь. По сравнению с данными Национального статистического комитета за 2020 г. разница с фактической площадью покрытых лесом земель (сомкнутость крон >49 %) составила 664,9 тыс. га (расхождение 7,4 %) [14]. По-видимому, это связано с зарастанием ранее нелесных земель (прежде всего сельскохозяйственного назначения) и отставанием процесса передачи ДКР вне его пределов в состав Гослесфонда. В целом, по данным дистанционного зондирования Земли, на момент исследований (2020 г.) площадь лесопокрытых земель оценивается нами в 8999,3 тыс. га, что соответствует 43,3 % лесистости. Эти оценки совпадают с аналогичными данными различных интернет-платформ, специализирующихся на учете типов земель и мониторинге биоразнообразия [15, 16]. Так, по данным проекта OneSoil, лесистость Беларуси уже составляет 42,3 %, а с учетом ДКР – 46,3 % [15].

**Заключение.** В настоящей работе на основе интеграции спутниковых картографических продуктов, данных дистанционного зондирования проведен анализ динамики лесного растительного покрова Беларуси. Установлено, что стабильный лесной покров (без изменений и признаков деградации за анализируемый 35-летний период) в настоящее время занимает 7209,0 тыс. га (75,8 %), а сформированный на ранее нелесных землях – 1459,5 тыс. га (14,7 %).

Потери лесов последних лет (2013–2020 гг.) выявлены на площади 516,5 тыс. га (5,2 %); потери лесов с последующим восстановлением лесного покрова (посадки лесных культур, естественное лесозаращивание) – на площади 421,6 тыс. га (4,5 %). На незначительной (<0,1 %) площади лесного фонда выявлены участки, на которых за рассматриваемый период наблюдалось чередование гибели и восстановления леса, а также отмечались потери лесов на участках, которые приобрели лесной покров после «нелесного состояния» в 1985 г.

В целом за период с 1985 по 2020 г. в результате различных факторов воздействия естественного и антропогенного происхождения (рубки леса, пожары, повреждение вредителями и т. д.) потери лесов составили 1569,3 тыс. га. За последний пятилетний период (2016–2020 гг.) среднегодовая площадь обезлесения составила 83,4 тыс. га в год, что в 2,3 раза выше по сравнению со средними показателями за 1985–2015 гг. Наибольшие площади потери лесов отмечались в 2016–2018 гг.

По сравнению с данными Национального статистического комитета на 2020 г. разница с фактической площадью покрытых лесом земель (в наших исследованиях с сомкнутостью крон >49 %) составила 664,9 тыс. га (расхождение 7,4 %). Площадь лесопокрытых земель по данным дистанционного зондирования оценивается нами в 8999,3 тыс. га, что соответствует 43,3 % лесистости.

Предложенный подход позволяет получать качественное и экономически выгодное информационное обеспечение для систем принятия управленческих решений по использованию лесных ресурсов на основе данных дистанционного зондирования.

#### Список использованных источников

1. Landsat continuity: Issues and opportunities for land cover monitoring / M. A. Wulder [et al.] // Remote Sens. Environ. – 2008. – Vol. 112, N 3. – P. 955–969. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.07.004>
2. Спутниковое картографирование растительного покрова России по данным спектрорадиометра MODIS / С. А. Барталев [и др.] // Совр. проблемы дистанц. зондиров. Земли из космоса. – 2011. – Т. 8, № 4. – С. 285–302.

3. Анализ динамики лесного покрова Восточной Европы на основе спутниковых данных с 1985 по 2012 / С. А. Турубанова [и др.] // *Rus. J. Ecosystem Ecol.* – 2017. – Т. 2, № 1. – Р. 1–11.
4. Global Land Analysis & Discovery [Electronic resource]. – Mode of access: <http://glad.geog.umd.edu/>. – Date of access: 24.01.2022.
5. Eastern Europe's forest cover dynamics from 1985 to 2012 quantified from the full Landsat archive / P. V. Potapov [et al.] // *Remote Sens. Environ.* – 2014. – Vol. 159. – P. 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2014.11.027>
6. Белова, Е. С. Методика создания безоблачных композитных изображений по спутниковым данным Landsat / Е. С. Белова, Д. В. Ершов // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса : сб. тез. 8-й Всерос. отк. конф., Москва, ИКИ РАН, 15–19 нояб. 2010 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://conf.rse.geosmis.ru/thesisshow.aspx?page=31&thesis=2439>. – Дата доступа: 06.04.2022.
7. Белова, Е. С. Предварительная обработка временных серий изображений Landsat- TM/ETM+ при создании безоблачных изображений местности / Е. С. Белова, Д. В. Ершов // *Совр. проблемы дистанц. зондиров. Земли из космоса.* – 2011. – Т. 8, № 1. – С. 73–82.
8. Гаврилюк, Е. А. Методика совместной обработки разносезонных изображений Landsat-TM и создания на их основе карты наземных экосистем Московской области / Е. А. Гаврилюк, Д. В. Ершов // *Совр. проблемы дистанц. зондиров. Земли из космоса.* – 2012. – Т. 9, № 4. – С. 15–23.
9. Potapov, P. Regional-scale boreal forest cover and change mapping using Landsat data composites for European Russia / P. Potapov, S. Turubanova, M. C. Hansen // *Remote Sens. Environ.* – 2011. – Vol. 115, N 2. – P. 548–561. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2010.10.001>
10. New global forest/non-forest maps from ALOS PALSAR data (2007–2010) / M. Shimada [et al.] // *Remote Sens. Environ.* – 2014. – Vol. 155. – P. 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2014.04.014>
11. Hansen, M. C. A review of large area monitoring of land cover change using landsat data / M. C. Hansen, T. R. Loveland // *Remote Sens. Environ.* – 2012. – Vol. 122. – P. 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.08.024>
12. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change / M. C. Hansen [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 342, N 6160. – P. 850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1244693>
13. The collection 6 MODIS burned area mapping algorithm and product / L. Giglio [et al.] // *Remote Sens. Environ.* – 2018. – Vol. 217. – P. 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2018.08.005>
14. Охрана окружающей среды в Республике Беларусь [2014—2020] : стат. сб. / И. В. Медведева [и др.]. – Минск : Нац. стат. ком. Респ. Беларусь, 2021. – 203 с.
15. OneSoil [Электронный ресурс]. – Mode of access: <https://onesoil.ai>. – Date of access: 06.04.2022.
16. Global Forest Watch [Электронный ресурс]. – Mode of access: <https://www.globalforestwatch.org>. – Date of access: 06.04.2022.

## References

1. Wulder M. A., White J. C., Goward S. N., Masek J. G., Irons J. R., Herold M., Woodcock C. E. Landsat continuity: issues and opportunities for land cover monitoring. *Remote Sensing of Environment*, 2008, vol. 112, no. 3, pp. 955–969. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.07.004>
2. Bartalev S. A., Egorov V. A., Ershov D. V., Isaev A. S., Lupyan E. A., Plotnikov D. E., Uvarov I. A. Satellite mapping of the vegetation cover of Russia according to the data of the MODIS spectroradiometer. *Sovremennye problemy distantsionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa* [Modern problems of remote sensing of the Earth from space], 2011, vol. 8, no. 4, pp. 285–302 (in Russian).
3. Turubanova S. A., Krylov A. M., Potapov P. V., Tyukavina A. Yu. Analysis of forest cover dynamics in Eastern Europe based on satellite data from 1985 to 2012. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 1–11 (in Russian).
4. *Global Land Analysis & Discovery*. Available at: <http://glad.geog.umd.edu/> (accessed 24.01.2022).
5. Potapov P. V., Turubanova S. A., Tyukavina A., Krylov A. M., McCarty J. L., Radeloff V. C., Hansen M. C. Eastern Europe's forest cover dynamics from 1985 to 2012 quantified from the full Landsat archive. *Remote Sensing of Environment*, 2014, vol. 159, pp. 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2014.11.027>
6. Belova E. S., Ershov D. V. Technique for creating cloud-free composite images from satellite data. *Sovremennye problemy distantsionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa: sbornik tezisov Vos'moi Vserossiiskoi otkrytoi konferentsii, Moskva, IKI RAN, 15–19 noyabrya 2010 g.* [Modern problems of remote sensing of the Earth from space : proceedings of the Eighth All-Russian open conference, Moscow, IKI RAS, November 15–19, 2010]. Available at: <http://conf.rse.geosmis.ru/thesisshow.aspx?page=31&thesis=2439> (accessed 06.04.2022) (in Russian).
7. Belova E. S., Ershov D. V. Pre-processing of time series of Landsat-TM/ETM+ images when creating cloud-free terrain images]. *Sovremennye problemy distantsionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa* [Modern problems of remote sensing of the Earth from space], 2011, vol. 8, no. 1, pp. 73–82 (in Russian).
8. Gavriluk E. A., Ershov D. V. Method of joint processing of multi-seasonal Landsat-TM images and creation of a map of terrestrial ecosystems of the Moscow region on their basis. *Sovremennye problemy distantsionnogo zondirovaniya Zemli iz kosmosa* [Modern problems of remote sensing of the Earth from space], 2012, vol. 9, no. 4, pp. 15–23 (in Russian).
9. Potapov P., Hansen M. C. Regional-scale boreal forest cover and change mapping using Landsat data composites for European. *Remote Sensing of Environment*, 2011, vol. 115, no. 2, pp. 548–561. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2010.10.001>
10. Shimada M., Itoh T., Motooka T., Watanabe M., Tomohiro Sh., Thapa R., Lucas R. New global forest/non-forest maps from ALOS PALSAR data (2007–2010). *Remote Sensing of Environment*, 2014, vol. 155, pp. 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2014.04.014>

11. Hansen M. C., Loveland T. R. A review of large area monitoring of land cover change using landsat data. *Remote Sensing of Environment*, 2012, vol. 122, pp. 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.08.024>
12. Hansen M. C., Potapov P. V., Moore R., Hancher M., Turubanova S. A., Tyukavina A. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*, 2013, vol. 342, no. 6160, pp. 850–853. <https://doi.org/10.1126/science.1244693>
13. Giglio L., Boschetti L., Roy D. P., Roy D. P., Humber M. L., Justice C. O. The collection 6 MODIS burned area mapping algorithm and product. *Remote Sensing of Environment*, 2018, vol. 217, pp. 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2018.08.005>
14. Medvedeva I. V., Kukharevich E. I., Vasilevskaya Zh. N., Dovnar O. A., Tarasyuk N. V., Lapkovskaya T. V., Mazaiskaya I. A., Palkovskaya E. M., Zdrok E. A. *Environmental Protection in the Republic of Belarus [2014–2020]. Statistical compendium*. Minsk, National Statistical Committee of the Republic of Belarus, 2021. 203 p. (in Russian).
15. *OneSoil*. Available at: <https://onesoil.ai> (accessed 06.04.2022).
16. *Global Forest Watch*. Available at: <https://www.globalforestwatch.org> (accessed 06.04.2022).

### Информация об авторах

*Груммо Дмитрий Геннадьевич* – канд. биол. наук, директор. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [zm.hrumo@gmail.com](mailto:zm.hrumo@gmail.com)

*Пугачевский Александр Викторович* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ieb\\_dir@biobel.by](mailto:ieb_dir@biobel.by)

*Русецкий Сергей Геннадьевич* – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [geobotany304@tut.by](mailto:geobotany304@tut.by)

*Зеленкевич Наталья Алексеевна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [zeliankevich\\_nat@mail.ru](mailto:zeliankevich_nat@mail.ru)

### Information about the authors

*Dzmitry G. Grummo* – Ph. D. (Biol.), Director. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [zm.hrumo@gmail.com](mailto:zm.hrumo@gmail.com)

*Alexander V. Pugachevsky* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ieb\\_dir@biobel.by](mailto:ieb_dir@biobel.by)

*Siarhei G. Rusetski* – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [geobotany304@tut.by](mailto:geobotany304@tut.by)

*Natallia A. Zeliankevich* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [zeliankevich\\_nat@mail.ru](mailto:zeliankevich_nat@mail.ru)

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК [635.9:582.475.5]:631.541

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-304-308>

Поступила в редакцию 11.02.2022

Received 11.02.2022

**Е. В. Кондратов, В. И. Торчик, А. А. Кураксина**

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **ОСОБЕННОСТИ ПРИВИВКИ ДЕКОРАТИВНЫХ ФОРМ РОДА *LARIX* MILL.**

**Аннотация.** На примере *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’ показано влияние возраста привоя и применяемого изолирующего материала на приживаемость и морфометрические параметры однолетних привитых растений. Установлено, что при прививке декоративных форм рода *Larix* Mill. наиболее эффективно использование в качестве привоя однолетних побегов и изоляция места прививки эластичной полиэтиленовой пленкой, что обеспечивает 100 %-ную приживаемость и оптимальное развитие кроны.

Использование в качестве привоя двулетних побегов с сохраненной системой ветвления и двулетних побегов с укороченным на 2/3 годичным приростом не приводит к существенному изменению приживаемости и увеличению высоты и диаметра однолетних привитых растений, но позволяет увеличить плотность кроны. Кроме того, использование этих побегов в качестве привоя может быть рекомендовано для размножения садовых форм, прививка которых осложнена из-за тонких однолетних побегов.

**Ключевые слова:** *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’, *Larix decidua* Mill., прививка, приживаемость, возраст привоя, прививочная совместимость, вегетативное размножение, подвой

**Для цитирования:** Кондратов, Е. В. Особенности прививки декоративных форм рода *Larix* Mill. / Е. В. Кондратов, В. И. Торчик, А. А. Кураксина // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 304–308. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-304-308>

**Yauhen V. Kandratav, Uladzimir I. Torchyk, Anna A. Kuraksina**

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

## **FEATURES OF GRAFTING DECORATIVE FORMS OF THE GENUS *LARIX* MILL.**

**Abstract.** The influence of the age of the scion and the insulating material on the survival rate and morphometric parameters of annual grafted plants is shown, using the example of *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’. It has been established that when grafting decorative forms of the genus *Larix* Mill. the most effective is the use of annual shoots as a scion with isolation of the grafting site with an elastic polyethylene film, which ensures 100 % survival and optimal development of the crown.

The use of 2-year-old shoots as a scion with a shortened by 2/3 annual growth does not lead to a significant change in survival rate and a decrease in the height and diameter of annual grafted plants, but it allows to increase the density of the crown. The use of these shoots as a graft can be recommended for propagation of garden forms, the grafting of which is complicated due to thin annual shoots.

**Keywords:** *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’, *Larix decidua* Mill., grafting, survival rate, age of the graft, graft compatibility, vegetative reproduction, rootstock

**For citation:** Kandratav Ya. V., Torchyk U. I., Kuraksina A. A. Features of grafting decorative forms of the genus *Larix* Mill. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 304–308 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-304-308>

**Введение.** В последние годы востребованными в ландшафтном дизайне стали декоративные формы видов рода лиственница (*Larix* Mill.). Для интродукционных испытаний в коллекцию Центрального ботанического сада было привлечено 5 декоративных форм лиственницы европейской (*Larix decidua* Mill.) – ‘Cizovice’, ‘Kornik’, ‘Puli’, ‘Fastigiata’ и ‘Horstmann Recurved’ и 8 декоративных форм лиственницы японской (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière) – ‘Pendula’, ‘Jacoben’s Pyramid’, ‘Diana’, ‘Stiff Weeper’, ‘Susterzeel’, ‘Grey Pearl’, ‘Cruwys Morchard’, ‘Blue Dwarf’. По результатам оценки все они рекомендованы для использования в зеленом строительстве республики.

Благодаря разнообразию габитуса и окраске хвои они будут востребованы как при озеленении небольших территорий, так и в составе сложных композиций [1]. Наибольший декоративный эффект достигается при использовании декоративных форм лиственниц в виде штамбовых растений, которые получают путем прививки черенков декоративных форм на штамбы видовых растений.

В научной литературе достаточно подробно освещены способы прививки плюсовых деревьев – представителей рода лиственница. В настоящее время успешно используется 4 способа, обеспечивающие от 70 до 100 % приживаемости прививок, – камбием на камбий, сердцевинной на камбий, в верхушечный расщеп и копулировка. Кроме того, имеются сведения, что прививка на прирост прошлого года существенно снижает приживаемость. Некоторые авторы указывают на успешные межвидовые привойно-подвойные комбинации [2–6]. В то же время практически отсутствуют сведения о размножении прививкой декоративных форм лиственниц, которые в большинстве случаев отличаются короткими и тонкими приростами, что существенно осложняет проведение прививки с использованием традиционных способов.

Цель настоящей работы – на примере декоративной формы *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’ установить возможность использования разновозрастного привоя и эффективность различных изолирующих материалов при проведении прививки.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования служила декоративная форма *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’. В качестве подвоя использовали трехлетние саженцы лиственницы европейской с закрытой корневой системой. Прививку проводили в фазу набухания почек на подвое в условиях отапливаемой теплицы (I декада февраля). Для этого за 2 недели до проведения прививки подвой помещали в теплицу, в которой поддерживалась круглосуточная температура 20–25 °С.

В качестве привоя использовали однолетние черенки, двулетние черенки с сохранением всей системы ветвления и двулетние черенки с укороченным на 2/3 длины приростом последнего года. Привои готовили непосредственно перед прививкой. Прививку осуществляли методом сердцевинной на камбий. Изолирующим материалом служили 1 см полоски эластичной полиэтиленовой пленки и резинка для изоляции прививок Flexiband A. Примерно через 40 дней после проведения прививки первую ослабляли, а весной следующего года удаляли. При наступлении устойчивой положительной температуры привитые растения выносили из теплицы и размещали под сеткой (степень затенения – 55 %).

Учет проводили после полного одревеснения побегов (I декада сентября). Прижившимися считали прививки, которые дали полноценный прирост и сформировали почки.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты опытов показали, что во всех вариантах приживаемость прививок превышала 90 % (табл. 1). При этом 100 %-ная приживаемость установлена при использовании в качестве привоя однолетних побегов с изоляцией места прививки эластичной полиэтиленовой пленкой.

Приживаемость прививок при использовании однолетних черенков и изоляции места прививки резинкой Flexiband A была на 5,5 % ниже. Практически аналогичный результат получен и при использовании в качестве привоя двулетних побегов с сохранением системы ветвления, а также двулетних черенков с укороченным на 2/3 длины приростом последнего года. Снижение приживаемости прививок, выполненных однолетними черенками с использованием резинки Flexiband A, по сравнению с их приживаемостью при изоляции эластичной полиэтиленовой пленкой обусловлено, по-видимому, тем, что резинка Flexiband A не обеспечивает надежное соединение привоя и подвоя, поскольку лиственница имеет достаточно жесткую древесину. По этой же причине меньше была и приживаемость двулетних черенков с сохраненной системой ветвления и двулетних черенков с укороченным на 2/3 годичным приростом, для изоляции которых использовали эластичную полиэтиленовую пленку. Нами также отмечено, что у двулетних привоев, в отличие от однолетних, еще до полного срастания компонентов прививки наблюдались набухание почек и рост побегов (за счет большего содержания в них питательных веществ), часть из которых позже отмирала. Эту особенность удалось несколько нивелировать за счет укорачивания на 2/3 длины однолетних приростов, что, однако, не привело к повышению приживаемости, но впоследствии сказалось на образовании большего количества побегов (табл. 1, рис. 1, с).

Следует отметить, что различия в приживаемости прививок оказались незначительными во всех вариантах опыта, что указывает на хорошую совместимость привоя и подвоя у японской и европейской лиственницы.

При изучении морфометрических параметров установлено, что как высота, так и диаметр кроны у растений, привитых однолетними побегами, изоляция которых проводилась полиэтиленовой пленкой, были выше на 8,6 %, чем при использовании резинки Flexiband A. Превышение этих показателей по сравнению с таковыми у растений, привитых двулетними побегами, составило 16 и 19,7 % соответственно (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Влияние возраста привоя, изолирующего материала на приживаемость и морфометрические параметры прививок садовой формы *Larix kaempferi* 'Blue Dwarf' (M ± m)

Table 1. Influence of the age of the graft, insulating material on the survival rate and morphometric parameters of grafts garden form *Larix kaempferi* 'Blue Dwarf' (M ± m)

Изолирующий материал	Возраст привоя, лет	Приживаемость, %	Высота, см	Диаметр кроны, см	Длина однолетнего прироста, см	Длина вторичного прироста, см	Суммарная длина однолетних побегов, см
Эластичная полиэтиленовая пленка	1	100	16,5 ± 1,6	13,7 ± 1,5	6,7 ± 0,9	5,5 ± 0,6	10,8 ± 1
Резинка для прививки Flexiband A	1	94,5	15,2 ± 2,2	13,7 ± 1,0	6,2 ± 0,7	5,2 ± 0,4	9,7 ± 0,7
Эластичная полиэтиленовая пленка	2	95,0	12,7 ± 1,7	10,4 ± 0,6	4,8 ± 0,5	2,5 ± 0,4	6,0 ± 0,6
	2*	94,7	13,1 ± 2,1	10,3 ± 0,8	4,8 ± 0,7	3,6 ± 0,5	6,0 ± 0,8

П р и м е ч а н и е. \* – двулетний побег с укороченным на 2/3 годичным приростом.

Развитие кроны у растений, привитых однолетним побегом, между вариантами существенно не различалось, но было лучше, чем у растений, привитых двулетними побегами (рис. 1), на 31,7 и 33 % соответственно, что было обусловлено меньшими приростами побегов основного и вторичного приростов у первых. Следует отметить, что вторичный прирост образовывался у 100 % растений, привитых однолетними побегами, и лишь у 14 %, привитых двулетними побегами.

Исследования показали, что тип изолирующего материала не оказал влияние на развитие хвои как у побегов основного, так и вторичного прироста. При этом у растений, привитых двулетними побегами, хвоя была короче (табл. 2).

Визуальный осмотр прижившихся прививок показал, что у декоративных форм представителей рода *Larix* Mill., как и у рода *Abies* Mill. [7], после снятия изоляции или разрушении прививочной резинки происходит набухание спящих почек и рост побегов, что сказывается на густоте кроны (рис. 2). Следует отметить, что у привитых однолетним побегом спящие почки тронулись в рост у 53,3 и 52,1 % растений, а у привитых двулетними – у 20 и 6,7 % соответственно. По окончании вегетации все побеги сформировали почки и полностью одревеснели.



Рис. 1. Однолетние растения, привитые однолетним (a), двулетним (b) и двулетним усеченным (c) побегами

Fig. 1. Annual plants grafted with an annual (a), biennial (b) and biennial truncated (c) shoots

Т а б л и ц а 2. Развитие однолетних привитых растений *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’ (M ± m)T a b l e 2. Development of annual grafted plants *Larix kaempferi* ‘Blue Dwarf’ (M ± m)

Тип изолирующего материала	Возраст привоя, лет	Длина однолетней хвои, см	Длина хвои на побегах вторичного прироста, см	Кол-во почек на однолетних побегах, шт.	Кол-во почек на побегах вторичного прироста, шт.	Кол-во однолетних побегов, шт.	Кол-во побегов вторичного прироста, шт.
Полиэтиленовая пленка	1	2,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	9,7 ± 0,8	8,0 ± 0,9	3,0 ± 0,3	7,9 ± 1,2
Резинка для прививки Flexiband A	1	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	8,8 ± 0,7	8,0 ± 0,5	3,1 ± 0,3	7,4 ± 0,6
Полиэтиленовая пленка	2	1,9 ± 0,1*	1,1 ± 0,1*	8,6 ± 0,6	6,5 ± 0,9	5,1 ± 0,6*	8,1 ± 1,3
	2**	1,3 ± 0,1*	1,2 ± 0,1*	8,1 ± 0,4	7,4 ± 0,5	7,6 ± 1,1*	10,1 ± 1,7

П р и м е ч а н и е. \*\* – двулетний побег с укороченным на 2/3 годичным приростом; \* – различия достоверны при  $p < 0,01$ .



Рис. 2. Побеги, образовавшиеся под резинкой Flexiband A (a), и после снятия полиэтиленовой пленки (b)

Fig. 2. Shoots formed under the elastic band Flexiband A (a) and after removing the polyethylene film (b)

**З а к л ю ч е н и е.** Исследования показали, что при прививке декоративных форм рода *Larix* Mill. наиболее эффективным является использование в качестве привоя однолетних побегов и изоляция места прививки эластичной полиэтиленовой пленкой, обеспечивающие 100 %-ную приживаемость и оптимальное развитие кроны.

Использование в качестве привоя двулетних побегов с сохраненной системой ветвления и двулетних побегов с укороченным на 2/3 годичным приростом не приводит к существенному изменению приживаемости и уменьшению высоты и диаметра однолетних привитых растений, но позволяет увеличить плотность кроны. Кроме того, использование в качестве привоя этих побегов может быть рекомендовано для размножения садовых форм, прививка которых осложнена из-за тонких однолетних побегов.

#### Список использованных источников

1. Опыт интродукции декоративных форм рода Лиственница (*Larix* Mill.) в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси / А. Ф. Келько [и др.]. // Тр. по интродукции и акклиматизации растений / Удмурт. федер. исслед. центр Урал. отд-ния РАН; под ред. А. В. Федорова. – Ижевск, 2021. – Вып. 1. – С. 91–95.
2. Авров, Ф. Д. Опыт создания прививочных лесосеменных плантаций лиственницы в Сибири / Ф. Д. Авров // Лесн. хоз-во. – 1969. – № 7. – С. 81–83.
3. Зеленьяк, А. К. Особенности вегетативного размножения декоративного формового разнообразия *Larix sibirica* для целей озеленения / А. К. Зеленьяк // Агроресомелиорация в XXI веке: состояние, проблемы, перспективы, фундаментальные и прикладные исследования: материалы Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов, посвящ. проф. Г. П. Сурмачу в честь 100-летия со дня рождения (Волгоград, 26–28 окт. 2015 г.) / редкол.: К. Н. Кулик (гл. ред.) [и др.]. – Волгоград, 2015. – С. 95–100.

4. Поляков, А. К. Состояние и долговечность привитых древесных растений в коллекционных насаждениях Донецкого ботанического сада НАН Украины / А. К. Поляков // Промышл. ботаника. – 2008. – Вып. 8. – С. 151–161.
5. Зеленьяк, А. К. Особенности вегетативного размножения лиственницы сибирской для создания лесосеменных плантаций / А. К. Зеленьяк, Е. В. Морозова, А. П. Иозус // Успехи совр. естествознания. – 2016. – № 11. – С. 38–42.
6. Тулик, П. В. Межвидовые и межродовые прививки лиственницы и пихты и особенности их роста / П. В. Тулик, Л. Ф. Поплавская // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб. науч. ст. / отв. ред. В. В. Усеня. – Гомель, 2007. – Т. 67. – С. 254–260.
7. Кондратов, Е. В. Влияние возраста привоя, изолирующего материала и срока прививки на приживаемость прививок у представителей рода *Abies* Mill. / Е. В. Кондратов, В. И. Торчик // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 263–267.

## References

1. Kelko A. F., Torchik V. I., Slesarenko M. O., Kuraksina A. A. Introduction experience of the larch (*Larix* Mill.) cultivars in the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Trudy po introduktsii i akklimatizatsii rastenii. Vypusk 1* [Proceedings on the introduction and acclimatization of plants. Iss. 1]. Izhevsk, 2021, pp. 91–95 (in Russian).
2. Avrov F. D. Experience in creating grafting forest seed plantations of larch in Siberia. *Lesnoe khozyaistvo* [Forestry], 1969, no. 7, pp. 81–83 (in Russian).
3. Zelenyak A. K. Peculiarities of vegetative propagation of the decorative form variety *Larix sibirica* for landscaping purposes. *Agrolesomeliatsiya v XXI veke: sostoyanie, problemy, perspektivy, fundamental'nye i prikladnye issledovaniya: materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh i spetsialistov, posvyashchennaya professoru G. P. Surmachu v chest'100-letiya so dnya rozhdeniya (Volgograd, 26–28 oktyabrya 2015)* [Agroforestry in the XXI century: state, problems, prospects, fundamental and applied research: materials of the International scientific and practical conference of young scientists and specialists dedicated to Professor G. P. Surmach in honor of the 100th anniversary of his birth (Volgograd, October 26–28, 2015)]. Volgograd, 2015, pp. 95–100 (in Russian).
4. Polyakov A. K. State and longevity of grafted woody plants in the collection plantations of the Donetsk Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Ukraine. *Promyshlennaya botanika* [Industrial botany], 2008, iss. 8, pp. 151–161 (in Russian).
5. Zelenyak A. K., Morozova E. V., Iozus A. P. Peculiarities of vegetative propagation of Siberian larch to create forest seed plantations. *Uspekhii sovremennogo yestestvoznaniya* [Successes of modern natural science], 2016, no. 11, pp. 38–42 (in Russian).
6. Tupik P. V., Poplavskaya L. F. Interspecific and intergeneric grafting of larch and fir and features of their growth. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sbornik nauchnykh statei. Tom 67* [Problems of forest science and forestry: a collection of scientific articles. Vol. 67]. Gomel, 2007, pp. 254–260 (in Russian).
7. Kondratov E. V., Torchik V. I. Influence of graft age, insulating material and grafting period on the survival rate of grafts in representatives of the genus *Abies* Mill. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2019, vol. 64, no. 3, pp. 263–267 (in Russian).

## Информация об авторах

Кондратов Евгений Валерьевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kondratov.20144@mail.ru

Торчик Владимир Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dendro@tut.by

Анна Андреевна Кураксина – аспирант. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

## Information about the authors

Yauhen V. Kondratov – Ph. D. (Biol.), Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kondratov.20144@mail.ru

Uladzimir I. Torchik – 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: dendro@tut.by

Anna A. Kuraksina – Postgraduate student. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

**АГЛЯДЫ**  
**REVIEWS**

УДК 577.241  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-309-320>

Поступила в редакцию 25.04.2022  
Received 25.04.2022

**И. Д. Вологовский, С. В. Пинчук, И. Б. Василевич**

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

**ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ –  
КЛЮЧЕВЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ БИОМОЛЕКУЛЫ,  
ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ НАПРАВЛЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
В СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ**

**Аннотация.** В статье рассматриваются механизмы дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в соматические клетки органов и тканей, лежащие в основе эмбриогенеза и естественных репаративных процессов в клетке и поддерживающие структурный и функциональный гомеостаз клеточного пула в разрезе целостного организма, что тем самым определяет судьбу индивидуальных клеток. Приводятся данные об адипогенной, остеогенной, хондрогенной, миогенной и эндотелиальной дифференцировках, приводящих к формированию в организме системных клеток мезодермального происхождения. Рассматривается также вопрос о том, каким образом осуществляется контроль каждого из видов дифференцировки и участие в них разнообразных регуляторных биомолекул, транскрипционных факторов, цитокинов и химокинов, находящихся в постоянном сложном взаимодействии друг с другом и образующих в клетке интегральную регуляторную сеть. Обсуждается участие в процессах дифференцировки ряда транскрипционных факторов (Runx2, Sox9, PPAR $\gamma$ , MyoD, GATA4 и GATA6), экспрессия которых находится под постоянным химическим контролем в пределах регуляторной сети клетки.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, дифференцировка, транскрипционные факторы, соматические клетки органов и тканей, эмбриогенез, регуляторные сети, регенеративные процессы

**Для цитирования:** Вологовский, И. Д. Транскрипционные факторы – ключевые регуляторные биомолекулы, определяющие направление дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в соматические клетки органов и тканей / И. Д. Вологовский, С. В. Пинчук, И. Б. Василевич // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 309–320. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-309-320>

**Igor D. Volotovskii, Sergey V. Pinchuk, Irina B. Vasilevich**

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

**TRANSCRIPTION FACTORS – KEY REGULATORY BIOMOLECULES DETERMINING  
THE DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS INTO THE SOMATIC CELLS  
OF ORGANS AND TISSUES**

**Abstract.** The mechanisms of differentiation of mesenchymal stem cells into the somatic cells of organs and tissues underlying embryogenesis and natural reparation processes and providing the structural and functional homeostasis of cells are considered. The data on adipogenic, osteogenic, chondrogenic, miogenic, and endothelial differentiations are given, which results in the formation of the cells of mesodermal origin in organism. The problem is discussed, how the transcription factors control each type of differentiation and participate in them using various regulatory biomolecules, transcription factors, cytokines, and chimokins being in complicate permanent interactions and forming the integrity regulatory network. The participation in differentiation processes of a number of transcription factors (Runx2, Sox9, PPAR $\gamma$ , MyoD, GATA4 and GATA6) is discussed, the expression of which is under a permanent chemical control within the cellular regulatory network.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, differentiation, transcription factors, somatic cells of organs and tissues, embryogenesis, regulatory networks, regenerative processes

**For citation:** Volotovskii I. D., Pinchuk S. V., Vasilevich I. B. Transcription factors – key regulatory biomolecules determining the differentiation of mesenchymal stem cells into the somatic cells of organs and tissues. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 309–320 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-309-320>

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) (мультипотентные стромальные или мезенхимальные стромальные клетки) стали объектом интенсивного изучения начиная с 1960–1970-х годов, после публикации основополагающих работ А. Я. Фриденштейна с сотр. [1]. Они показали, что МСК, являющиеся компонентами мезодермы, способны дифференцироваться в ряд соматических клеток, что является пусковым событием эмбриогенеза организма.

Много усилий было предпринято для разработки методов выделения и фенотипирования МСК. Способность МСК к дифференцировке натолкнула исследователей на мысль о возможности использования этих клеток для структурного и функционального восстановления тканей при некоторых серьезных заболеваниях [2]. Предположение состояло в следующем. МСК должны мигрировать к месту повреждения, внедряться в него и дифференцироваться в функциональные клетки, что в конечном счете должно приводить к их размножению, регенерации поврежденных или патологически измененных компонентов тканей. Опубликованы сотни работ, выполненных на животных и пациентах, с целью убедиться, что данное предположение работает. В массиве данных, однако, результаты по регенеративной эффективности клеточной трансплантации варьируются от высокого терапевтического эффекта до его полного отсутствия. Скорее всего, клетки не всегда попадают в патологический очаг. Более того, предполагается, что после ассоциации с патологически измененными мишенями они дифференцируются в клетки немезодермального происхождения [3]. Это противоречит сложившейся догме о том, что МСК могут дифференцироваться только в системные клетки мезодермального происхождения [4]. Скорее всего, наблюдаемый разнородностью данных можно объяснить сложным характером реализации биологического действия МСК. Рассматриваются несколько механизмов реализации репаративных эффектов под влиянием МСК:

- а) дифференцировка МСК, их внедрение в поврежденную мишень и замена поврежденных клеток на функционально активные;
- б) паракринная активность МСК – синтез ими биологически активных молекул (цитокинов, транскрипционных факторов, различных факторов роста);
- в) перенос из МСК в клетки-мишени органелл (митохондрий, потенциалобразующих ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , белков и пептидов);
- г) перенос в клетки-мишени РНК, гормонов и различных химических соединений с помощью лизосом, образующихся из материала плазматических мембран МСК по механизму эндоцитоза.

Перечисленные механизмы неравноценны, что особенно заметно проявляется при местном или внутривенном введении МСК в организм [4]. Благодаря действию разнообразных факторов меняются и резидентные клетки самой мишени – они пролиферируют, дифференцируются и, по некоторым данным, продуцируют иммуноглобулины. Важно отметить еще одно обстоятельство. Все синтезируемые МСК паракринные соединения обладают низкой растворимостью и, оказываясь в окружении МСК после их синтеза клеткой, не попадают в кровеносное русло и не переносятся с ним по всему организму. Таким же свойством характеризуются и биологически активные продукты, содержащиеся в экзосомах. Иными словами, все события, связанные с репаративным действием МСК, разворачиваются в нише МСК. Следовательно, можно предположить, что при использовании МСК для повышения эффективности лечения нужно их вводить прямо в очаг повреждения, а не внутривенно в кровеносное русло.

Кроме того, впечатляющим свойством стволовых клеток является их относительно высокая скорость экспансии и способность при их использовании избегать крайне нежелательных аллогенных эффектов [5, 6].

Как упоминалось выше, МСК секретируют различные факторы роста, цитокины и белки экстрацеллюлярного матрикса, поддерживающие выживаемость клеток. Теоретически благодаря этому МСК способны репарировать поврежденные клетки, т. е. снижать уровень повреждения

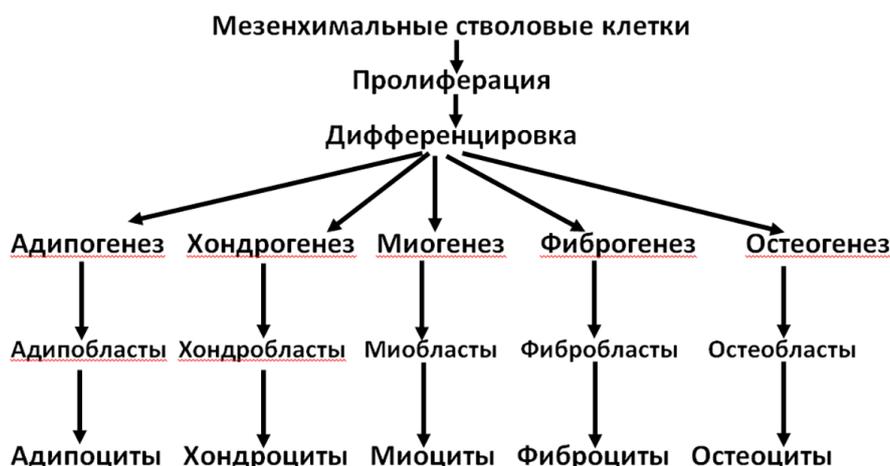


Рис. 1. Традиционная схема направлений дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в системные клетки органов и тканей мезодермального происхождения

Fig. 1. Traditional scheme of differentiation directions of the mesenchymal stem cells into the system cells of organs and tissues of mesodermal origin

и ускорять репарацию. Подтверждением этому служат данные по оптимизации МСК структурного состояния клеток ниши, как это показано для гемопоэтических стволовых клеток и клеток сосудистого эндотелия [7]. Очевидно, что использование МСК при лечении различных заболеваний не всегда приводит к ожидаемому лечебному эффекту. Это связано с особенностями механизмов реализации биологического действия МСК в каждом конкретном случае. Учитывая это обстоятельство, приступить к разработке конкретной технологии лечения того или иного заболевания с помощью стволовых клеток нельзя, не имея четкого представления о механизмах их действия. Поэтому перед клинической стадией исследования обязательным является проведение модельных экспериментов на уровне клеток, тканей и целого организма, поскольку без этого введение МСК пациентам в большинстве случаев обречено на получение отрицательного результата или слабого эффекта.

Настоящий обзор посвящен рассмотрению наиболее важной стадии метаболизма МСК в организме после их введения в него, механизмам дифференцировки МСК и их превращению в соматические клетки органов и тканей.

**Механизмы дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток.** Первые работы по дифференцировке МСК продемонстрировали, что эти клетки обладают способностью превращаться в клетки мезодермального происхождения, а именно в клетки миогенной, адипогенной, остеогенной и хондрогенной линий (рис. 1).

В ходе дифференцировки МСК в определенный клеточный тип в запуске процесса дифференцировки и реализации ее последующих стадий важную роль играет множество стимулов и ингибиторов, включая различные цитокины, факторы роста, молекулы экстрацеллюлярного матрикса и транскрипционные факторы (ТФ). Некоторые факторы выполняют *in vitro* роль индуцирующего стимула (см. таблицу).

#### Факторы, индуцирующие дифференцировку МСК в некоторые типы соматических клеток [8]

#### The factors inducing MSK transdifferentiation into some types of somatic cells [8]

Индуктор	Концентрация	Эффект	Направление дифференцировки
Дексаметазон	1 мкМ	Увеличение депозита жира в цитоплазме	Адиποциты
3-Изобутил-метилксантин	0,5 мМ		
Инсулин	0,01 мг/мл		
Аскорбиновая кислота	50 мкМ	Увеличение активности щелочной фосфатазы	Остеоциты
Дексаметазон	100 нМ		

Окончание таблицы

Индуктор	Концентрация	Эффект	Направление дифференцировки
TGF- $\beta$ 1 Аскорбиновая кислота Дексаметазон	10 нг/мл 50 мкг/мл 100 нМ		Хондроциты
TGF- $\beta$ 1	1, 2, 5, 10 нг/мл	Стимулирование экспрессии генов, специфических для гладкомышечных клеток	Клетки гладкомышечной ткани
5-азациитидин	3, 10 $\mu$ М	Ингибирование ДНК-метилтрансферазы	Кардиомиоциты
VEGF	10, 50 нг/мл	Фосфорилирование VEGF-RII и стимулирование его активности	Клетки эндотелия

В настоящее время речь идет в первую очередь о транскрипционных факторах, которые контролируют процесс дифференцировки МСК в зрелые клетки различных типов. При этом ТФ могут не только стимулировать дифференцировку, но и подавлять ее.

**Остеогенная дифференцировка.** Дифференцировка МСК в остециты *in vitro* индуцируется при инкубации клеток в среде, содержащей  $\beta$ -глицерофосфат, дексаметазон, фосфат аскорбиновой кислоты, смесь таких факторов, как трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ ), костный морфогенетический белок (bone morphogenic protein, BMP) и витамин D3 [9]. Главными транскрипционными факторами, играющими ключевую роль в дифференцировке МСК в остециты, являются связанный с Runt транскрипционный фактор 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) и транскрипционный фактор остерикс (transcription factor Sp7, OSTERIX) [10].

Наиболее важен Runx2, являющийся регулятором образования костной ткани. Под его влиянием МСК дифференцируются в преостеобласты и подавляется адипогенная и хондрогенная дифференцировки. Ген *Runx2* содержит короткий ДНК-связывающий домен, а сам белок образует *in vitro* гетеродимеры, в составе которых представлен комплекс Cbfb (*core binding factor  $\beta$* )/Pebp2 $\beta$  (*polyoma enhancer binding protein 2 $\beta$* ). Экспрессия *Runx2* регулируется несколькими сигнальными путями, а именно Wnt, BMP, Notch и комплексом регуляторных молекул (Smad, Twist, Ноха и HIF $\alpha$ ). В этом ансамбле происходят сложные межмолекулярные взаимодействия, сопровождающиеся активацией или ингибированием его, что в конечном счете сказывается на активности *Runx2*. Более того, отсутствие одного из факторов приводит к изменению остеогенной направленности дифференцировки в адипогенную или хондрогенную.

**Хондрогенная дифференцировка.** *In vitro* хондрогенная дифференцировка МСК индуцируется путем добавления в среду фосфата аскорбиновой кислоты, дексаметазона, бычьего сывороточного альбумина, линолевой кислоты, пирувата натрия, трансферрина, селеновой кислоты, пролина, L-глутамина и TGF- $\beta$ 1 [11]. МСК утрачивают присущую им фибробластоподобную форму и превращаются в округлые клетки. Транскрипционные факторы играют важную роль в регуляции экспрессии генов коллагенов типов 2, 9, 10, 11, агреккана и хрящевого белка, которые являются маркерами хондроцитов. Главная роль при этом отводится фактору Sox9 (определяющая пол область Y-бокса 9, sex determining region Y-box 9), который контролирует экспрессию ключевых генов хондрогенеза. Так, Sox9 влияет на экспрессию гена коллагена 9, связываясь с его промоторным участком, и образует трансактивирующие комплексы с другими белками [12]. Изменение содержания Sox9 посредством сверхэкспрессии или ингибирования соответствующей mRNA сопровождается изменением содержания mRNA маркерных генов коллагенов типов 2, 9, 11 и хрящевого протеогликана агреккана. Более того, введение в МСК комбинации Sox9, Sox6 и Sox5 эффективно стимулировало их хондрогенную дифференцировку [13].

Изучались также и другие факторы, оказывающие влияние на хондрогенез МСК: факторы, кодируемые генами семейства NOX (NOXA2, NOXD9, NOXD10, NOXD11, NOXD13), STAT3 (сигнальный преобразователь и активатор транскрипции-3, signal transducer and activator of transcription 3), Wnt11, YAP (yes-ассоциированный белок, yes-associated protein). NOXA2 и YAP оказывают ингибирующее действие на хондрогенную дифференцировку МСК, тогда как остальные факторы приводят к ее стимуляции [14–16].

Между различными факторами и регуляторными молекулами в МСК, по-видимому, складываются сложные взаимоотношения. Так, белок Smad3 способен образовывать комплекс с Sox9, что негативно сказывается на хондрогенной дифференцировке. В свою очередь активность Smad 2 и 3 в МСК контролируются TGF- $\beta$ 1. STAT3, Wnt11 и YAP взаимодействуют также с другими факторами, но в конечном счете их влияние отражается на активности Sox9.

**Адипогенная дифференцировка.** Адипогенная дифференцировка стимулируется при инкубации клеток в среде, содержащей 3-изобутил-1-метилксантин, инсулин, индометацин, триидотионин, фосфат аскорбиновой кислоты [17]. Дифференцировка МСК в адипоциты заключается в накоплении липидов во внутриклеточных вакуолях. Ингибирование или активация некоторых транскрипционных факторов имеет существенное значение для реализации клеточных событий, приводящих к адипогенной дифференцировке.

На данный момент идентифицировано несколько ключевых факторов. Одним из них является активируемый пролиферацией пероксисомный рецептор  $\gamma$  (peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ), который регулирует экспрессию генов, ответственных за адипогенную дифференцировку МСК [18]. Две изоформы фактора – PPAR $\gamma$ 2 и PPAR $\gamma$ 1 – стимулируют адипогенез. Активность самого PPAR $\gamma$  можно модифицировать различными лигандами, например TAZ (транскрипционный коактиватор с PDZ-связывающим доменом, transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), СЕВРВ (усиливающий связывание с ССААТ (cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine), белок бета (ССААТ-enhancer-binding protein beta) или RDM16 (РНК-направляемое метилирование ДНК 16, RNA-directed DNA methylation 16).

Любопытно, что фактор GATA-2 (член семейства ядерных белков, содержащих ДНК-связывающие домены цинкового пальца (zinc-finger) и распознающих нуклеотидные последовательности G-A-T-A), который контролирует пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток, наряду с данной дифференцировкой регулирует и адипогенез. Подавление активности этого транскрипционного фактора стимулирует адипогенез, а активация GATA-2 его ингибирует [19]. Показано также, что Foxa1 (forkhead box protein A1), как и GATA-2, снижает адипогенез МСК и экспрессию PPAR $\gamma$  и СЕВРВ. В свою очередь HOXC8 также ингибирует адипогенез в МСК. Сообщается, что TWIST (транскрипционные факторы класса bHLH, basic helix-loop-helix) выполняет регуляторную роль в адипогенной дифференцировке. Увеличение содержания Twist-1 в культуре МСК связано с увеличением экспрессии маркеров адипогенной дифференцировки [20]. Позднее было обнаружено, что уменьшение его содержания в среде miRNK-194 коррелирует с одновременным увеличением экспрессии фактора COUP-TF2 (транскрипционный фактор COUP 2, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2), который, как было показано ранее, выполняет ключевую роль в адипогенезе МСК [21]. Оказались причастными к адипогенной дифференцировке и транскрипционные факторы Sox2 и Oct4 (октамер-4, octamer-binding transcription factor 4), участвующие в дифференцировке МСК по другим направлениям.

**Миогенная дифференцировка. Клетки скелетной мускулатуры.** Данная дифференцировка имеет место, если добавить в среду инкубации МСК 5-азациитидин [22] или проинкубировать МСК со скелетными миоцитами, неонатальными фибробластами или кардиомиоцитами. Миогенная дифференцировка активируется и транскрипционными факторами Pax3 (парный бокс 3, paired box 3), MyoD (белок, детерминирующий миобласты, myoblast determination protein), Myf-5 (миогенный фактор 5, myogenic factor 5) [23]. Сигналы от этих транскрипционных факторов индуцируют образование склеротома и дермомиотома. В ходе экспрессии Pax3 клетки мигрируют через дорзомедиальный порог дермомиотома, после чего формируется миотом и запускается миогенная дифференцировка [23]. Pax3 и Pax7 являются членами специального семейства транскрипционных факторов. Их принято рассматривать в качестве ключевых регуляторов миогенной дифференцировки, так как они работают на ранних стадиях образования скелетной мускулатуры и ее регенерации. Сверхэкспрессия Pax3 в МСК стимулирует миогенную и подавляет адипогенную, остеогенную и хондрогенную дифференцировки [24]. В другом исследовании при введении генов Pax3 и Pax7 в МСК также регистрировалась стимуляция миогенной дифференцировки [23].

MyoD, Myf-5 и миогенин экспрессируются в МСК, находящихся в процессе миогенной дифференцировки. Сверхэкспрессия MyoD ингибирует активность Twist-1 через образование miRNA-206 и стимулирует миогенез [25]. Другой ТФ – TAZ, являющийся модулятором остеогенеза и адипогенеза – модифицирует миогенез, т. е. принимает участие в его регуляции [26]. Сходные данные получены для IGF II (инсулиноподобный фактор роста 2, insulin-like growth factor-II), TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухолей альфа, tumor necrosis factor- $\alpha$ ) и Smad3 [27].

*Кардиомиоциты.* МСК способны дифференцироваться в кардиомиоциты после 2–3-недельного культивирования в обычной среде на основе DMEM и фетальной бычьей сыворотки с добавлением 5-азацитина. Идентифицировано несколько ТФ, выступающих в роли регуляторов кардиомиогенной дифференцировки. В первую очередь речь идет о GATA4, Nkx2.5 и Wnt11, сверхэкспрессия которых стимулирует кардиомиогенез МСК. Эффект становится более выраженным, если в среду внести миоциты [28]. В ходе дифференцировки МСК в кардиомиоциты экспрессия Nkx2.5 и GATA4 значительно усиливается при добавлении VEGF (фактор роста эндотелия сосудов, vascular endothelium growth factor). Как и следовало ожидать, антитела против VEGF подавляют эффект фактора роста.

Миокард относится к гладкомышечной мускулатуре, клетки которой содержат кардиогенный ТФ, несущий два центра связывания SRF (сывороточный ответный фактор, serum response factor). Миокардины – это ТФ гладкомышечных клеток и кардиомиоцитов. Их сверхэкспрессия *in vitro* контролирует экспрессию кардиомиогенных генов. Увеличение экспрессии в МСК таких белков, как тиоредоксин-1 (Trx1) и Notch1, значительно усиливает дифференцировку данных клеток в кардиомиоциты [29, 30].

*Клетки гладкомышечной ткани.* Наиболее эффективным индуктором дифференцировки МСК в гладкомышечные клетки является TGF- $\beta$ . Он контролирует гены маркеров гладкомышечной мускулатуры  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -гладкомышечный актин, alpha smooth muscle actin), SMMHC (тяжелая цепь миозина гладких мышц, smooth muscle myosin heavy chain) и кальпонина. TGF- $\beta$ 1 ингибирует пролиферацию МСК и контролирует дифференцировку гладкомышечных клеток, а 5-азацитин и амфотерицин стимулируют дифференцировку МСК в миообласты [31].

Отмечают несколько ТФ, выполняющих роль регуляторов дифференцировки МСК в клетки гладкомышечной ткани: миокардин, GATA6 и SRF. В свою очередь эти ТФ сами находятся под влиянием других регуляторных биомолекул. Так, ингибитор MEK (митогенактивированная протеинкиназа, MAPK-extracellular regulated kinase) стимулирует экспрессию маркеров, а SPC (sphingosyl phosphorylcholine) запускает данную дифференцировку через зависимый от Rho-киназы механизм. Обнаружено также, что SPC стимулирует экспрессию миокардин-зависимого ТФ. Большое внимание привлек GATA6, активируемый S1P (sphingosine 1-phosphate), который сам стимулирует дифференцировку гладкомышечных клеток [32]. Кроме того, TGF- $\beta$  активирует транскрипционные факторы GATA6 и SRF, после чего наблюдается увеличение экспрессии упоминаемых ранее маркерных генов дифференцировки  $\alpha$ -SMA, SM22- $\alpha$  (гладкомышечный белок 22 альфа, smooth muscle 22 alpha), SMMHC и кальпонина. Интересным оказался эффект PPAR $\gamma$ . Этот фактор ингибировал дифференцировку МСК в миофибробласты, которые имеют сходные характеристики с клетками гладкой мускулатуры. Трансфекция siRNA для подавления активности PPAR $\gamma$  в МСК приводит к увеличению экспрессии  $\alpha$ -SMA [33]. Экспрессия изоформы ламинина LM-521 в среде, содержащей TGF- $\beta$ , сопровождается усилением дифференцировки МСК в клетки гладкомышечной мускулатуры [34]. Кроме того, ольфактомедин 2 (Olfm2) стимулирует данную дифференцировку, индуцированную TGF- $\beta$ . Нокаут Olfm2 сопровождается подавлением экспрессии маркеров дифференцировки, а его сверхэкспрессия увеличивает экспрессию данных маркеров [35]. Olfm2 связывается с SRF, в результате чего дифференцировка растет [35].

Таким образом, к ключевым факторам, влияющим на дифференцировку МСК в клетки гладкой мускулатуры, относят GATA6, SRF и TGF- $\beta$ . Однако экспрессия PPAR $\gamma$  подавляет дифференцировку МСК. Работа по выяснению роли различных транскрипционных факторов на рассматриваемую дифференцировку МСК продолжается.

**Эндотелиальная дифференцировка.** Есть мнение, что при введении дифференцированных МСК в клетки эндотелия открывается перспектива лечения сердечно-сосудистых заболеваний [36]. В настоящее время ведется интенсивное накопление информации по данному вопросу. Установлено, что ключевым регуляторным фактором эндотелиальной дифференцировки является Sox18 [37]. Показано также, что сам Sox18 находится под контролем VEGFR-II (VEGF рецептор 2, VEGF receptor 2) [37]. В ходе эндотелиальной дифференцировки МСК регистрируется увеличение экспрессии NOXA7 и NOXB3, а NOXB5, другой фактор этого семейства, стимулирует экспрессию VEGFR-II. Сходным образом на дифференцировку влияет Notch, опосредуя образование в МСК капиллярноподобных структур *in vitro* и *in vivo*. При этом после нокаута Notch1 эти структуры уже не формируются, причем на фоне снижения экспрессии специфических маркеров. При изучении эндотелиогенеза обнаружен очень интересный факт: биомеханические воздействия в виде стационарного стрессового сдвига увеличивают экспрессию маркеров эндотелиогенеза и дифференцировку МСК в эндотелиобласты [37]. Для этого использовали двуслойные тубулярные скаффолды, в которых можно было смоделировать микроокружение кровеносного сосуда, воздействуя на них подачей жидкости внутрь под давлением. МСК, которые культивировались на внутреннем слое скаффолда, приобретали эндотелиальный фенотип на фоне значительного увеличения экспрессии эндотелиальных маркеров.

Таким образом, дифференцировка МСК – важнейший этап эмбриогенеза, в ходе которого создается строительный клеточный материал для формирования полноценного организма, его органов и тканей. Детальное изучение процессов дифференцировки преследует не только получение детальной информации о наиболее интимной и загадочной тайне формирования и функционирования организма, но и имеет важное прикладное значение, так как МСК начали широко применяться в регенеративной медицине для восстановления структурной и функциональной целостности органов и тканей. Клетки можно легко изолировать из различного биологического материала, а затем культивировать в искусственных средах, получая на выходе миллионы активных МСК. Чаще всего в ходе изучения дифференцировки МСК по традиционным направлениям (рис. 1) получают системные клетки мезодермального происхождения, а именно адипоциты, хондроциты, остеоциты, клетки гладкомышечной ткани, кардиомиоциты, эндотелиальные

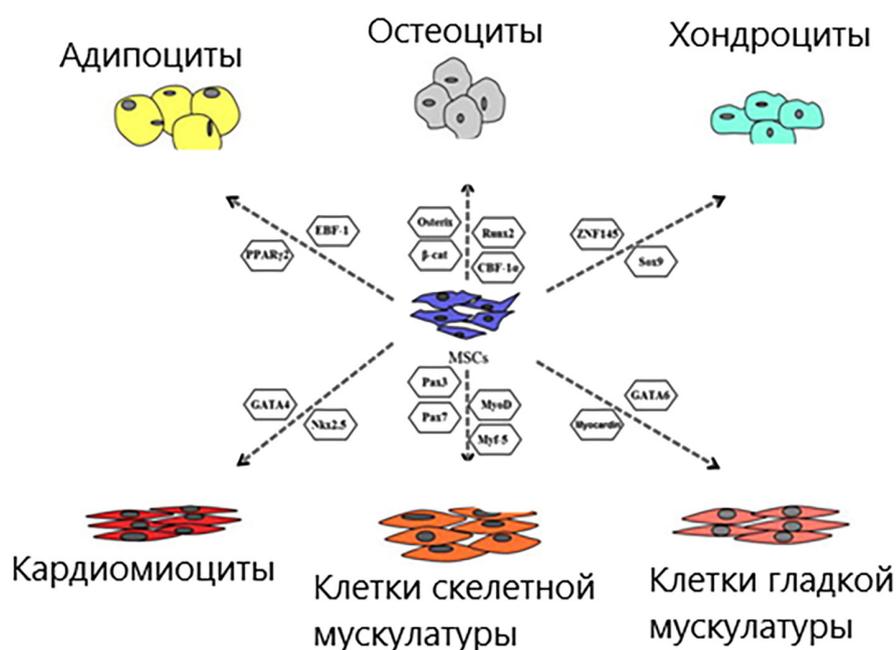


Рис. 2. Схема участия различных факторов в регуляции дифференцировки МСК по мезодермальным направлениям [8]

Fig. 2. Participation of various factors in the regulation of MSC differentiation on mesodermal lineages [8]

клетки. В то же время достаточно широк перечень и других направлений (например, описаны дифференцировки МСК в нейроны или гепатоциты). Каждая из дифференцировок МСК связана с экспрессией определенного набора белков. Однако полного понимания механизмов, лежащих в основе дифференцировки МСК по разным направлениям, до сих пор нет. Для этого следовало бы идентифицировать все сигнальные молекулы и транскрипционные факторы, связанные с конкретной дифференцировкой МСК, определить сигнальные цепочки, запускающие данный процесс, принимая во внимание, что все известные на данный момент факторы находятся в режиме постоянного кросстока. Способность МСК дифференцироваться по конкретному направлению основывается на регуляции, или супрессии, определенных генов. Дифференцировка МСК запускается специфическими транскрипционными факторами, ассоциированными со своей сигнальной цепочкой (рис. 2). Так, например, остеогенная дифференцировка в первую очередь связана с фактором Runx2, который, однако, ингибирует адипогенную и хондрогенную дифференцировки. Экспрессия самого Runx2 регулируется такими сигнальными факторами, как Wnt, BMP и Notch. Этот принцип соблюдается и при хондрогенезе, когда основным фактором Sox9 регулируется Nkx3.2 и Runx2, и при адипогенезе, когда основным фактором PPAR $\gamma$  регулируется Wnt, Hedgehog, NELL-1, BMP и IGF. Сходная ситуация наблюдается и в случае других дифференцировок. Тесное взаимодействие между факторами дифференцировки должно означать, что в клетке существует регуляторная сеть, в рамках которой многие факторы находятся в режиме кросстока. Функция компонентов данной сети сводится к стимуляции или подавлению той или иной дифференцировки.

Несколько подходов было предпринято с целью введения в геном МСК генов транскрипционных факторов. Однако использование плазмид для доставки ДНК в МСК оказалось малоэффективным. Тем не менее эти работы продолжают ввиду их перспективности для регенеративной медицины. В идеале направленное введение в МСК генов новых транскрипционных факторов позволило бы получать, с одной стороны, трансдифференцированные МСК по нескольким направлениям, что расширило бы возможности регенеративной медицины, а с другой стороны, позволило бы избежать риска получения дифференцированных продуктов нежелательного направления.

Следует отметить еще одно обстоятельство. В литературе практически отсутствуют работы, оценивающие чистоту культуры получаемых дифференцированных клеток. Ведь перекрестное участие одних и тех же транскрипционных факторов при дифференцировке МСК по различным направлениям не исключает присутствия в дифференцированном продукте клеток различных линий. Очевидно, это может иметь решающее значение для лечебной эффективности регенеративного процесса. Остается, к сожалению, непонятным, как работает регуляторная сеть, как включается та или иная сигнальная цепь для запуска синтеза строительных и функциональных белков и как осуществляется последующее формирование органов и тканей.

### Список использованных источников

1. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants / A. J. Friedenstein [et al.] // *Exp. Hematol.* – 1978. – Vol. 6, N 5. – P. 440–444.
2. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century / A. I. Caplan, S. P. Bruder // *Trends Mol. Med.* – 2001. – Vol. 7, N 6. – P. 259–264. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02016-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02016-0)
3. Herzog, E. L. Plasticity of marrow-derived stem cells / E. L. Herzog, L. Chai, D. S. Krause // *Blood.* – 2003. – Vol. 102, N 10. – P. 3483–3493. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1664>
4. Prockop, D. J. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms / D. J. Prockop // *Mol. Ther.* – 2009. – Vol. 17, N 6. – P. 939–946. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>
5. Chen, S. L. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction / S.-L. Chen [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2004. – Vol. 94, N 1. – P. 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.034>
6. le Blanc, K. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation / K. le Blanc, O. Ringden // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2005. – Vol. 11, N 5. – P. 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.01.005>

7. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs / M. Crisan [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
8. Almalki, S. G. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells / S. G. Almalki, D. K. Agrawal // *Differentiation*. – 2016. – Vol. 92, N 1–2. – P. 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>
9. Friedenstein, A. J. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers / A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, U. V. Gerasimov // *Cell Tissue Kinet.* – 1987. – Vol. 20, N 3. – P. 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>
10. Augello, A. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells / A. Augello, C. de Bari // *Hum. Gene Ther.* – 2010. – Vol. 21, N 10. – P. 1226–1238. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.173>
11. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells / T. Okamoto [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 295, N 2. – P. 354–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00661-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00661-7)
12. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an *in vitro* model / Z. H. Wang [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2014. – Vol. 47, N 4. – P. 279–286. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133539>
13. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells mediated by the combination of SOX trio SOX5, 6, and 9 genes complexed with PEI-modified PLGA nanoparticles / J. S. Park [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, N 14. – P. 3679–3688. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.063>
14. Role of Hox genes in stem cell differentiation / A. Seifert [et al.] // *World J. Stem Cells*. – 2015. – Vol. 7, N 3. – P. 583–595. <https://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.583>
15. Yes-associated protein (YAP) is a negative regulator of chondrogenesis in mesenchymal stem cells / A. Karystinou [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2015. – Vol. 17, N 1. – P. 147. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0639-9>
16. Contribution of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells / M. Kondo [et al.] // *Arthritis Rheumatol.* – 2015. – Vol. 67, N 5. – P. 1250–1260. <https://doi.org/10.1002/art.39036>
17. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway / H. H. Zhang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, N 7. – P. e6189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006189>
18. Molecular mechanisms of PPAR-gamma governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation / H. Zhuang [et al.] // *Curr. Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 11, N 3. – P. 255–264. <https://doi.org/10.2174/1574888x10666150531173309>
19. Regulation of adipocyte differentiation of bone marrow stromal cells by transcription factor GATA-2 / Y. Okitsu [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 364, N 2. – P. 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.031>
20. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment / S. Isenmann [et al.] // *Stem Cells*. – 2009. – Vol. 27, N 10. – P. 2457–2468. <https://doi.org/10.1002/stem.181>
21. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression / B. C. Jeong [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2014. – Vol. 5, N 11. – P. e1532. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.485>
22. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications / L. Jackson [et al.] // *Postgrad. Med.* – 2007. – Vol. 53, N 2. – P. 121–127. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.32215>
23. Charytonowicz, E. Alternate PAX3 and PAX7 C-terminal isoforms in myogenic differentiation and sarcomagenesis / E. Charytonowicz // *Clin. Transl. Oncol.* – 2011. – Vol. 13, N 3. – P. 194–203. <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0640-y>
24. Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage / E. J. Gang [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2008. – Vol. 314, N 8. – P. 1721–1733. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.016>
25. MyoD transcription factor induces myogenesis by inhibiting Twist-1 through miR-206 / D. Koutalios [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2015. – Vol. 128, N 19. – P. 3631–3645. <https://doi.org/10.1242/jcs.172288>
26. TAZ as a novel enhancer of MyoD-mediated myogenic differentiation / H. Jeong [et al.] // *FASEB J.* – 2010. – Vol. 24, N 9. – P. 3310–3320. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151324>
27. TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF-kappaB activation and impairment of IGF-1 signaling pathway/ Q. Zhao [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – Vol. 458, N 4. – P. 790–795. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.026>
28. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation / K. E. Hatzistergos [et al.] // *Circ. Res.* – 2010. – Vol. 107, N 7. – P. 913–922. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.222703>
29. Thioredoxin-1 (Trx1) engineered mesenchymal stem cell therapy increased pro-angiogenic factors, reduced fibrosis and improved heart function in the infarcted rat myocardium / S. C. Suresh [et al.] // *Int. J. Cardiol.* – 2015. – Vol. 201. – P. 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.117>
30. Activation of Notch1 signalling promotes multi-lineage differentiation of c-Kit(POS)/NKX2.5(POS) bone marrow stem cells: implication in stem cell translational medicine / R. Ding [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 91. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0085-2>
31. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing / G. Chamberlain [et al.] // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25, N 11. – P. 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>
32. Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of mesoangioblasts towards smooth muscle. A role for GATA6 / C. Donati [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6, N 5. – P. e20389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020389>

33. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma negatively regulates the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward myofibroblasts in liver fibrogenesis / S. Jia [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* – 2015. – Vol. 37, N 6. – P. 2085–2100. <https://doi.org/10.1159/000438567>
34. Mesenchymal stromal cells for sphincter regeneration: role of laminin isoforms upon myogenic differentiation / T. Seeger [et al.] // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10, N 9. – P. e0137419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137419>
35. Shi, N. From nerve to blood vessel: a new role of Olfm2 in smooth muscle differentiation from human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells / N. Shi, S. Y. Chen // *J. Biomed. Res.* – 2015. – Vol. 29, N 4. – P. 261–263. <https://doi.org/10.7555/JBR.29.20150027>
36. Pankajakshan, D. *In vitro* differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells / D. Pankajakshan, V. Kansal, D. K. Agrawal // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2013. – Vol 7, N 11. – P. 911–920. <https://doi.org/10.1002/term.1483>
37. Ikhapoh, I. A. Synergistic effect of angiotensin II on vascular endothelial growth factor-A-mediated differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells / I. A. Ikhapoh, C. J. Pelham, D. K. Agrawal // *Stem Cell Res. Ther.* – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 4. <https://doi.org/10.1186/scrt538>

## References

1. Friedenstein A. J., Ivanov-Smolenski A. A., Chajlakjan A. R., Gorskaya U. F., Kuralesova A. I., Latzinik N. W., Gerasimov U.W. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental Hematology*, 1978, vol. 6, no. 5, pp. 440–444.
2. Caplan A. I., Bruder S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 2001, vol. 7, no. 6, pp. 259–264. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02016-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02016-0)
3. Herzog E. L., Chai L., Krause D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003, vol. 102, no. 10, pp. 3483–3493. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1664>
4. Prockop D. J. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Molecular Therapy*, 2009, vol. 17, no. 6, pp. 939–946. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.62>
5. Chen S.-L., Fang W.-W., Ye F., Liu Y.-H., Qian J., Shan S.-J. [et al.]. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, 2004, vol. 94, no. 1, pp. 92–95. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.034>
6. Le Blanc K., Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005, vol. 11, no. 5, pp. 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.01.005>
7. Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C. W., Corselli M., Park T. S. [et al.]. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 2008, vol. 3, no. 3, pp. 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
8. Almalki S. G., Agrawal D. K. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 2016, vol. 92, no. 1–2, pp. 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>
9. Friedenstein A. J., Chailakhyan R. K., Gerasimov U. V. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics*, 1987, vol. 20, no. 3, pp. 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>
10. Augello A., de Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*, 2010, vol. 21, no. 10, pp. 1226–1238. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.173>
11. Okamoto T., Aoyama T., Nakayama T., Nakamata T., Hosaka T., Nishijo K., Nakamura T., Kiyono T., Toguchida J. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, vol. 295, no. 2, pp. 354–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00661-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00661-7)
12. Wang Z. H., Li X. L., He X. J., Wu B. J., Xu M., Chang H. M. [et al.]. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an *in vitro* model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2014, vol. 47, no. 4, pp. 279–286. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133539>
13. Park J. S., Yang H. N., Woo D. G., Jeon S. Y., Do H. J., Lim H. Y., Kim J. H., Park K. H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells mediated by the combination of SOX trio SOX5, 6, and 9 genes complexed with PEI-modified PLGA nanoparticles. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, no. 14, pp. 3679–3688. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.063>
14. Seifert A., Werheid D. F., Knapp S. M., Tobiasch E. Role of Hox genes in stem cell differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 583–595. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.583>
15. Karystinou A., Roelofs A. J., Neve A., Cantatore F. P., Wackerhage H., de Bari C. Yes-associated protein (YAP) is a negative regulator of chondrogenesis in mesenchymal stem cells. *Arthritis Research and Therapy*, 2015, vol. 17, no. 1, p. 147. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0639-9>
16. Kondo M., Yamaoka K., Sakata K., Sonomoto K., Lin L., Nakano K., Tanaka Y. Contribution of the interleukin-6/STAT3 signaling pathway to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatology*, 2015, vol. 67, no. 5, pp. 1250–1260. <https://doi.org/10.1002/art.39036>
17. Zhang H. H., Huang J., Duvel K., Boback B., Wu S., Squillace R. M., Wu C. L., Manning B. D. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, p. e6189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006189>

18. Zhuang H., Zhang X., Zhu C., Tang X., Yu F., Shang G. W., Cai X. Molecular mechanisms of PPAR-gamma governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 2015, vol. 11, no. 3, pp. 255–264. <https://doi.org/10.2174/1574888x10666150531173309>
19. Okitsu Y., Takahashi S., Minegishi N., Kameoka J., Kaku M., Yamamoto M., Sasaki T., Harigae H. Regulation of adipocyte differentiation of bone marrow stromal cells by transcription factor GATA-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, vol. 364, no. 2, pp. 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.031>
20. Isenmann S., Arthur A., Zannettino A. C., Turner J. L., Shi S., Glackin C. A., Gronthos S. TWIST family of basic helix-loop-helix transcription factors mediate human mesenchymal stem cell growth and commitment. *Stem Cells*, 2009, vol. 27, no. 10, pp. 2457–2468. <https://doi.org/10.1002/stem.181>
21. Jeong B. C., Kang I. H., Hwang Y. C., Kim S. H., Koh J. T. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression. *Cell Death and Disease*, 2014, vol. 5, no. 11, p. e1532. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.485>
22. Jackson L., Jones D. R., Scotting P., Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *Journal of Postgraduate Medicine*, 2007, vol. 53, no. 2, pp. 121–127. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.32215>
23. Charytonowicz E., Matushansky I., Castillo-Martin M., Hricik T., Cordon-Cardo C., Ziman M. Alternate PAX3 and PAX7 C-terminal isoforms in myogenic differentiation and sarcomagenesis. *Clinical and Translational Oncology*, 2011, vol. 13, no. 3, pp. 194–203. <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0640-y>
24. Gang E. J., Bosnakovski D., Simsek T., To K., Perlingeiro R. C. Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage. *Experimental Cell Research*, 2008, vol. 314, no. 8, pp. 1721–1733. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.016>
25. Koutalianos D., Koutsoulidou A., Mastroyiannopoulos N. P., Furling D., Phylactou L. A. MyoD transcription factor induces myogenesis by inhibiting Twist-1 through miR-206. *Journal of Cell Science*, 2015, vol. 128, no. 19, pp. 3631–3645. <https://doi.org/10.1242/jcs.172288>
26. Jeong H., Bae S., An S. Y., Byun M. R., Hwang J. H., Yaffe M. B., Hong J. H., Hwang E. S. TAZ as a novel enhancer of MyoD-mediated myogenic differentiation. *FASEB Journal*, 2010, vol. 24, no. 9, pp. 3310–3320. <https://doi.org/10.1096/fj.09-151324>
27. Zhao Q., Yang S. T., Wang J. J., Zhou J., Xing S. S., Shen C. C. [et al.]. TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF-kappaB activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, vol. 458, no. 4, pp. 790–795. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.026>
28. Hatzistergos K. E., Quevedo H., Oskouci B. N., Hu Q., Feigenbaum G. S., Margitich I. S. [et al.]. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation Research*, 2010, vol. 107, no. 7, pp. 913–922. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.222703>
29. Suresh S. C., Selvaraju V., Thirunavukkarasu M., Goldman J. W., Husain A., Palesty J. A., Sanchez J. A., McFadden D. W., Maulik N. Thioredoxin-1 (Trx1) engineered mesenchymal stem cell therapy increased pro-angiogenic factors, reduced fibrosis and improved heart function in the infarcted rat myocardium. *International Journal of Cardiology*, 2015, vol. 201, pp. 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.117>
30. Ding R., Jiang X., Ha Y., Wang Z., Guo J., Jiang H., Zheng S., Shen Z., Jie W. Activation of Notch1 signaling promotes multi-lineage differentiation of c-Kit(POS)/NKX2.5(POS) bone marrow stem cells: implication in stem cell translational medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 2015, vol. 6, no. 1, p. 91. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0085-2>
31. Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 2007, vol. 25, no. 11, pp. 2739–2749. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>
32. Donati C., Marseglia G., Magi A., Serrati S., Cencetti F., Bernacchioni C. [et al.]. Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of mesoangioblasts towards smooth muscle. A role for GATA6. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 5, p. e20389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020389>
33. Jia S., Liu X., Li W., Xie J., Yang L., Li L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma negatively regulates the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward myofibroblasts in liver fibrogenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, vol. 37, no. 6, pp. 2085–2100. <https://doi.org/10.1159/000438567>
34. Seeger T., Hart M., Patarroyo M., Rolauffs B., Aicher W. K., Klein G. Mesenchymal stromal cells for sphincter regeneration: role of laminin isoforms upon myogenic differentiation. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 9, p. e0137419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137419>
35. Shi N., Chen S. Y. From nerve to blood vessel: a new role of Olfm2 in smooth muscle differentiation from human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Journal of BioMed Research*, 2015, vol. 29, no. 4, pp. 261–263. <https://doi.org/10.7555/JBR.29.20150027>
36. Pankajakshan D., Kansal V., Agrawal D. K. *In vitro* differentiation of bone marrow derived porcine mesenchymal stem cells to endothelial cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2013, vol. 7, no. 11, pp. 911–920. <https://doi.org/10.1002/term.1483>
37. Ikhapoh I. A., Pelham C. J., Agrawal D. K. Synergistic effect of angiotensin II on vascular endothelial growth factor-A-mediated differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 2015, vol. 6, no. 1, p. 4. <https://doi.org/10.1186/scrt538>

### 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

*Василевич Ирина Борисовна* – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina-vasilevich@yandex.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

*Irina B. Vasilevich* – 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: irina-vasilevich@yandex.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.19:582.711.71

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-321-331>

Поступила в редакцию 07.02.2022

Received 07.02.2022

**Я. Л. Страх, О. С. Игнатовец**

*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь*

## **ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТОВ *RUBUS CHAMAEMORUS L.***

**Аннотация.** В статье приведена систематизированная оценка накопления морошкой приземистой (*Rubus chamaemorus L.*) северных и южных популяций биологически активных веществ (витаминов, жирных кислот, флавоноидов, антоцианов, проантоцианидинов, фенольных кислот). Определена роль вторичных метаболитов в формировании биологического потенциала плодов и листьев *R. chamaemorus L.*, а также отмечена высокая антиоксидантная и антирадикальная активность экстрактов плодов морошки в модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Приведены результаты научных работ, посвященных изучению антимикробной активности плодов в отношении *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. При этом отмечено, что количество исследований, посвященных изучению вторичных метаболитов морошки приземистой на южной границе ареала, незначительно. Определена биологическая значимость плодов и наземной листовой массы, изучены вопросы о перспективах культивирования этих растений на южной границе ареала, а также о их практическом применении в фармацевтической и пищевой промышленности. Отмечена тенденция к культурному и полукультурному выращиванию данного вида. Описаны климатические условия и географические зоны произрастания морошки приземистой. Приведены современные данные о химическом составе различных частей морошки приземистой, произрастающей в различных условиях окружающей среды.

**Ключевые слова:** морошка приземистая (*Rubus chamaemorus L.*), биологически активные вещества, ареал обитания, вторичные метаболиты, фенольные соединения, макронутриенты, листья, плоды, культивирование, промышленный сбор

**Для цитирования:** Страх, Я. Л. Химический состав и биологическая активность метаболитов *Rubus chamaemorus L.* / Я. Л. Страх, О. С. Игнатовец // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 321–331. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-321-331>

**Yana L. Strakh, Olga S. Ignatovets**

*Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus*

## **CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF METABOLITES OF *RUBUS CHAMAEMORUS L.***

**Abstract.** The article describes the climatic conditions and the geographical zones of cloudberry (*Rubus chamaemorus L.*) growth. A trend towards cultural and semi-cultural cultivation of this species was noted. The current state of research on the chemical composition of various parts of cloudberry squat, growing in various environmental conditions, is highlighted. A systematic assessment of accumulation of biologically active substances (vitamins, fatty acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, phenolic acids) of this plant of northern and southern populations was carried out. The role of secondary metabolites in the formation of the biological potential of *R. chamaemorus L.* fruits and leaves is described. High antioxidant and antiradical activities of cloudberry fruit extracts in *in vitro* and *in vivo* model systems are also noted. The review presents the results of scientific works devoted to the study of the antimicrobial activity of fruits against *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. There is a lack of research of secondary metabolites of the plant on the southern border of the range. The biological significance of fruits and ground leaf mass, as well as the prospects for cultivation on the southern border of the range and their practical use in the pharmaceutical and food industries are highlighted.

**Keywords:** cloudberry (*Rubus chamaemorus L.*), biologically active substances, habitat, secondary metabolites, phenolic compounds, macronutrients, leaves, fruits, cultivation, industrial collection

**For citation:** Strakh Ya. L., Ignatovets O. S. Chemical composition and biological activity of metabolites of *Rubus chamaemorus L.* *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 321–331 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-321-331>

Морошка приземистая (*Rubus chamaemorus* L.) – многолетнее травянистое растение, относящееся к семейству *Rosaceae*. Произрастает в арктических и умеренно-северных широтах Северной Америки, Финляндии, Норвегии, Швеции, Англии и России [1]. Широко распространена в полярно-арктической, тундровой, лесотундровой зонах. На севере Республики Беларусь проходит южная граница ареала обитания морошки приземистой [2]. Вид включен в Красную книгу Беларуси 1-го и 2-го изданий (1981, 1993). Относится ко II категории охраны (EN) [3]. В Польше морошка считается видом, находящимся под угрозой исчезновения, и строго охраняется законом [4]. Охраняется данный вид и на территории Германии [5].

Несмотря на то что свойства участков произрастания морошки достаточно широкие (от сухих до влажных), она предпочитает более влажную почву, особенно верховые болота, влажные торфяные и дерновые почвы. Отмечено, что вид достаточно хорошо адаптирован к кислой почве. Морошка теневынослива, однако оптимальный рост растение демонстрирует на достаточно открытых освещенных участках [6].

*R. chamaemorus* L. – двудомное растение, в дикой природе преобладают мужские особи, при этом наличие 10 % мужских растений считается достаточным для обеспечения высокого уровня плодоношения [7]. Женские особи предпочитают произрастать в более влажных зонах, обеспечивающих большую урожайность [8].

Полупромышленный крупномасштабный коммерческий сбор урожая ягод производится в Скандинавии, Англии и России. Для Северной Америки характерны большие площади произрастания морошки, однако из-за труднодоступного расположения сбор урожая намного меньше, чем в странах Скандинавии. В Северной Америке ресурсный потенциал данного вида больше в естественной среде обитания. Представленную сегодня на рынке морошку получают в основном из дикорастущих растений. В настоящее время наблюдается тенденция к культурному и полукультурному выращиванию данного вида, так как спрос на ягоды намного превышает предложение. Так, активно идут научные исследования по разработке сортов, пригодных для нужд селекции и обладающих дополнительными качествами, увеличивающими перспективы коммерческого выращивания.

Морошка – подходящая культура для северных территорий, богатых торфяниками, но не имеющих обширных сельскохозяйственных угодий хорошего качества. Болота Республики Беларусь также могут стать площадкой для выращивания морошки, и данное направление заслуживает изучения и развития. Однако в Республике Беларусь приоритетной задачей является сохранение и поддержание этого вида в естественной среде обитания. Данную задачу можно решить только путем научного подхода и анализа различных факторов, действующих на белорусские популяции морошки. С этой точки зрения актуальными становятся сбор и обобщение информации о морошке различных климатических зон и сравнение этой информации с данными о белорусских популяциях, а также о других представителях растения южной границы ареала обитания.

Морошка – эксплерент, обладающий слабой конкурентной способностью. Семена морошки приземистой обладают достаточно низкой всхожестью, что затрудняет генеративное размножение вида. Следовательно, для сохранения биоразнообразия, особенно в зонах, где морошка является растением, находящимся под угрозой исчезновения, необходимо исследовать произрастающие популяции с целью выявления среди них наиболее приспособленных к конкретным условиям среды. Кроме того, необходимо установить закономерности накопления некоторых метаболитов как индикаторов негативного воздействия окружающих факторов на различные популяции с целью их идентификации и разработки методов, позволяющих устранить или уменьшить влияние этих метаболитов.

Во многих экспериментальных работах по исследованию растительного сырья приведены данные о содержании различных биологически активных соединений в зависимости от зон произрастания и геоклиматических условий, влияния неблагоприятных факторов окружающей среды и воздействия патогенов.

Анализ научных работ показал, что в морошке приземистой содержание основных макроэлементов в наиболее северных популяциях достигает 0,8 г жира, 2,4 г белка и 8,6 г углеводов на 100 г плодов [9]. Более южные популяции характеризуются следующими показателями: 0,3 г жира, 1,9 г белка и 3,6 г углеводов [10].

Углеводы в плодах морошки приземистой представлены растворимыми сахарами (5,0–6,3 %), пектиновыми веществами (0,3–2,4 %) и клетчаткой (3,8 %) [11]. Основная доля приходится на редуцирующие сахара в виде глюкозы (158 мг/г СВ) и фруктозы (94 мг/г СВ) [12]. Углеводные компоненты находятся в основном в мякоти ягод, а жиры и белки доминируют в косточках. Основная часть липидов сосредоточена в семенах, где их содержание колеблется в пределах 9,1–12,4 % [13]. Причем большее содержание липидов отмечается у семян северных популяций. Жирнокислотный состав липидов представлен в основном олеиновой, линолевой и линоленовой кислотами, общее содержание которых достигает 90–93 %. Из них преобладает линолевая кислота  $C_{18:2}$  ( $\omega$ -6) – 43,1–48,7 %, на втором месте линоленовая  $C_{18:3}$  ( $\omega$ -3) – 27,9–35,5 %. Количество олеиновой кислоты  $C_{18:1}$  ( $\omega$ -9) составляет 13,7–16,7 %, но содержится также  $C_{18:1}$  ( $\omega$ -7), хотя и в незначительном количестве – 0,5–0,6 % [14]. Насыщенные жирные кислоты представлены в основном пальмитиновой кислотой, содержание которой не превышает 2 % [15]. Отмечается тенденция к увеличению содержания полиненасыщенных жирных кислот в семенах популяций более северных широт, что можно связать со среднегодовой температурой окружающей среды [16].

В большинстве работ наряду с общим анализом жирнокислотного состава липидов исследовали также компоненты, входящие в состав эфирного масла. Так, обнаружено, что большую часть эфирного масла составляют свыше 30 ароматических соединений. В основном это соединения, связанные с биосинтезом бензойной кислоты, которая в высокой концентрации содержится в плодах. Доминирующими ароматическими соединениями эфирного масла являются бензиловый спирт (31,3 %), метилбензоат (4,5 %), ацетофенон (2,9 %), 2-фенилэтанол (2,7 %), 1-фенилэтанол (2,3 %), этилбензоат (2,1 %) и 4-винилфенол (1,8 %) [17]. Терпеноиды ( $\alpha$ -фенхен, гераниол, линалоол, линалилацетат,  $\alpha$ -терпиниол, изопинокамфон и цис- и транс-линолооксиды) составляют лишь незначительную часть эфирного масла – около 1,3 % [18].

Установлено, что в состав эфирного масла морошки входят также ванилин, метилваниллат и ацетованиллон, которые оказывают влияние на его ароматические свойства. Обнаружено, что из нативных веществ эфирного масла при его нагревании образуются некоторые соединения гетероциклической природы (так называемые вторичные продукты). Они влияют на органолептические свойства продуктов из плодов морошки, подвергнутых термической обработке [18].

Наибольший интерес для промышленного применения представляет выделение масла из обработанных плодов морошки – жмыха, который образуется при производстве ликероводочной продукции. Масло, полученное из данного сырья методом сверхкритической экстракции, обладает хорошими физико-химическими и органолептическими показателями [19] и может применяться в косметической и пищевой промышленности.

Плоды морошки отличаются также достаточно высоким содержанием витаминов, особенно витамина С и каротиноидов. Содержание аскорбиновой кислоты варьируется в пределах 220–320 мг/100 г свежих плодов, произрастающих на севере ареала обитания [20]. На южной границе ареала обитания в плодах морошки приземистой содержание витамина С составляет 61,6–143,8 мг% в сухом веществе (СВ) [21].

Каротиноиды в плодах морошки приземистой представлены в основном  $\beta$ -каротином. Присутствуют также ксантофиллы зеаксантин, лютеин, антераксантин, неоксантин, виолаксантин [22]. Сравнительный анализ указанных БАВ показал вариабельность их накопления в зависимости от популяции. Для растений южного ареала характерны следующие значения:  $2319,51 \pm 203,48$  мг/100 г сухой массы, 83 % из которых приходится на  $\beta$ -каротин [23]. На северной границе ареала обитания микропопуляция *R. chamaemorus* L. содержала 95 мг/100 г сухой массы [24].

Особое внимание в последнее время уделяется изучению фенольных соединений морошки приземистой, так как эта группа веществ обладает широким спектром биологической активности. По их содержанию плоды морошки приземистой являются одними из лидеров среди северных ягод. Общее содержание фенольных соединений составляет 4270 мг/100 г СВ [25]. В *R. chamaemorus* L. они представлены эллаготанинами (77,1 %), проантоцианидинами (5,9 %), фенолкарбоновыми кислотами (12,2 %), флавоноидами (2,6 %) и антоцианами (0,4 %) [25]. Химическая структура эллаготанина представлена на рис. 1.

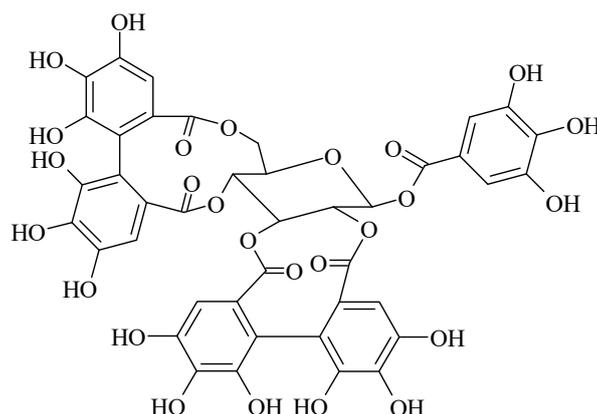


Рис. 1. Химическая структура эллаготанина

Fig. 1. Chemical structure of ellagitannin

Высокую биологическую ценность морошки приземистой определяют эллаготанины. В невысоких концентрациях они обладают антиоксидантным, антиатерогенным, антитромботическим, противовоспалительным и антиангиогенным действием [12]. В эллаготанинах преобладают тримерный ламбертианин С и димерный сангуин Н-6 – 35 и 43 % соответственно от их общего количества [11, 12]. Распределение изомеров сангуина определяется последовательностью Н-6 > Н-2 > Н-10. На долю Н-2 и Н-10 приходится 9 и 6 % соответственно, на долю мономерного касуариктина/потентиллина – 6,5 % от общего содержания эллаготанинов [26].

Фенолкарбоновые кислоты представлены в основном галловой, кофейной, р-кумаровой, феруловой, изоферуловой, бензойной кислотами [27].

Также в морошке идентифицированы следующие проантоцианидины: (+)-катехин, (–)-эпикатехин, резорцин, флороглюцин, процианидин В-2 [28].

Антоцианы встречаются в виде цианидин-3-О-(2-О-глюкозил)рутинозида, цианидин-3-О-софорозида, цианидин-3-О-глюкозида, цианидин-3-О-рутинозида [26–28]. Флавоноиды представлены в основном кверцетин-3-О-глюкуронидом и кверцетин-3-О-глюкозидом.

Данные о содержании фенольных соединений *R. chamaemorus* L. северных ареалов обитания представлены в таблице.

#### Фенольные соединения *R. chamaemorus* L. северных ареалов обитания

##### Phenolic compounds of *R. chamaemorus* L. of northern habitats

Фенольное соединение	Содержание	Лит. источник
<i>Гидролизуемые танины, в том числе эллаготанины</i>		
Сангуин Н-6	95,44 мг/г АЭ	[12]
Сангуин Н-2	19,82 мг/г АЭ	[12]
Сангуин Н-10	13,46 мг/г АЭ	[12]
Ламбертианин С	76,57 мг/г АЭ	[12]
Касуариктин/потентиллин	15,49 мг/г АЭ	[12]
<i>Проантоцианидины</i>		
(+)-Катехин	0,50 мг/100 г СП	[27]
(–)-Эпикатехин	0,80 мг/100 г СП	[27]
Процианидин В-2	0,40 мг/100 г СП	[27]
<i>Фенолкарбоновые кислоты</i>		
Эллаговая кислота	144,30 мг/г АЭ	[12]
	60,00 мг/100 г СП	[29]
Галловая кислота	4,20 мг/100 г СП	[27]
	63,0 (14,40–273,70) мг/100 СВ	[30]

Окончание таблицы

Фенольное соединение	Содержание	Лит. источник
p-Кумаровая кислота	4,3 мг/100 г СП	[27]
	31,6 (22,30–44,80) мг/100 СВ	[30]
Феруловая кислота	0,83 мг/г АЭ	[12]
	1,0 мг/100 г СП	[27]
	15,60 (6,30–39,00) мг/100 СВ	[30]
Кофейная кислота	1,15 мг/г АЭ	[12]
	1,00 мг/100 г СП	[27]
	7,70 (5,70–10,60) мг/100 СВ	[30]
Ванилиновая кислота	3,80 (2,70–5,20) мг/100 СВ	[30]
<i>Флавоноиды</i>		
Кверцетин	0,50 мг/100 г	[31]
Кверцетин-3-О-глюкоронид	0,50 мг/100 г СП	[27]
<i>Антоцианы</i>		
Цианидин-3-софорозид	0,20 мг/100 г СП	[27]
Цианидин-3(2G-гликозилрутинозид)	0,20 мг/100 г СП	[27]
Цианидин-3-глюкозид	0,40 мг/100 г СП	[27]
Цианидин-3-рутинозид	0,90 мг/100 г СП	[27]

Примечание. АЭ – ацетоновый экстракт, СВ – сухое вещество, СП – свежие плоды.

Для южной границы ареала обитания *R. chamaemorus* L. количественные показатели индивидуальных соединений исследованы незначительно. В литературе имеются данные о содержании эллаговой кислоты – в пределах 312 мг/100 г СП [4].

На рис. 2 представлены химические структуры основных фенольных соединений *R. chamaemorus* L.

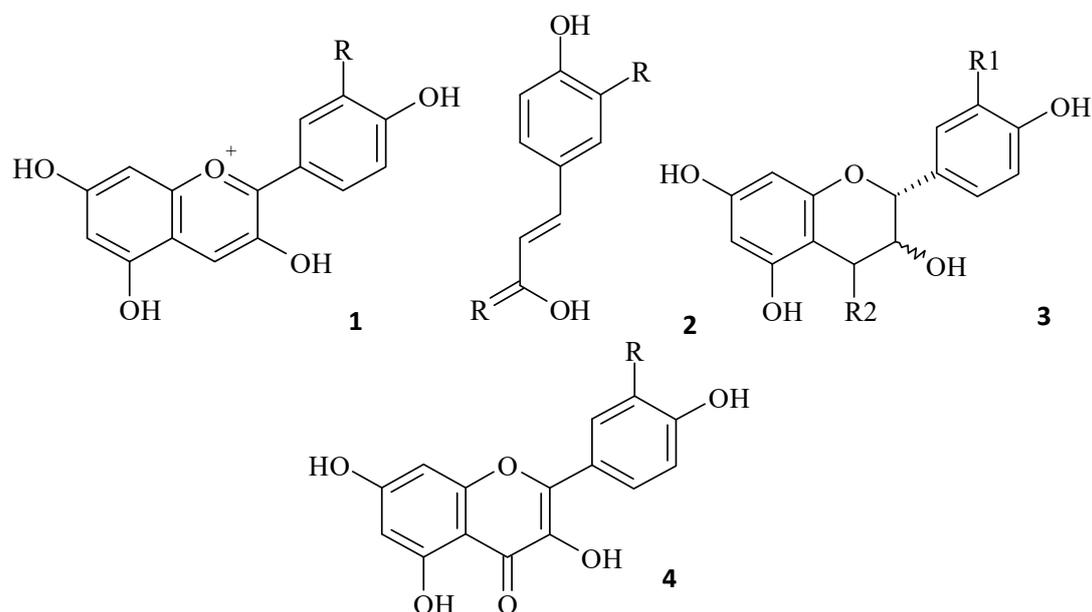


Рис. 2. Химическая структура: **1** – антоцианидины (R=OH – цианидин, R=H – пеларгонидин), **2** – оксикоричные кислоты (R=H – p-кумаровая кислота, R=OH – кофейная кислота, R=OCH<sub>3</sub> – феруловая кислота), **3** – проантоцианидины (R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H (2R,3S) (+)-катехин, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H (2R,3R) (-)-эпикатехин), **4** – флавоноиды (R=OH – кверцетин, R=H – кемпферол)

Fig. 2. Chemical structure: **1** – anthocyanidins (R=OH – cyanidin, R=H – pelargonidin), **2** – hydroxycinnamic acids (R=H – p-coumaric acid, R=OH – caffeic acid, R=OCH<sub>3</sub> – ferulic acid), **3** – proanthocyanidins (R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H (2R,3S) (+)-catechin, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H (2R,3R) (-)-epicatechin), **4** – flavonoids (R=OH – quercetin, R=H – kaempferol)

В листьях *R. chamaemorus* L. идентифицированы следующие С-гликозиды флавонов: эмбинин, 2,3-диацетилэмбинин, 3,4-диацетилэмбинин, 2-ацетилэмбинин, 3-ацетилэмбинин, 4-ацетилэмбинин и 2,4-диацетилэмбинин [32].

В морошке приземистой присутствуют сапонины. Кумарины и фурукумарины в морошке приземистой встречаются как в свободной форме, так и в гликозидной (в сумме 2,0–4,4 мг/100 г плодов) [33]. Обзор современной литературы показал, что качественный и количественный состав сапонинов, кумаринов и фурукумаринов изучен недостаточно.

Благодаря наличию фенольных соединений, витаминов, антоцианов экстракты плодов и листьев морошки приземистой обладают антиоксидантным эффектом. Данный вид биологической активности был установлен в модельных реакциях *in vitro* и *in vivo*. Экстракты плодов (мякоти) *in vitro* проявляли радикал-связывающую активность ( $IC_{50} = 11,8 \pm 0,6$  мг/г) и хелатирующую активность ( $EC_{50} = 34,0 \pm 4,0$  мг/г) [34].

На модели *Drosophila melanogaster* установлено, что экстракт плодов морошки проявлял георпротекторные свойства у самок. Потребление экстракта с пищей увеличивало медианную продолжительность жизни и показатель 90 % смертности достигал 11–19 %, а также снижало популяционную скорость старения самок до 13 %. При этом экстракт морошки не влиял на устойчивость самок дрозофил к голоданию и окислительному стрессу. Влияние экстракта плодов морошки на продолжительность жизни самцов было выражено слабо, а в отдельных случаях носило отрицательный характер [35].

Антиоксидантная активность сока красной морошки хорошо коррелирует с его фенольным составом. В красных ягодах значительно более высокое содержание антоцианов, особенно цианидина и производных пеларгонидина, чем в более распространенных желтых плодах. И наоборот, в желтом соке более высокое содержание эллагитанина. Изучение кормления насекомых *in vivo* показало воздействие соков на перекисное окисление липидов у чувствительного подгула *Drosophila melanogaster*. У молодых самок мух наблюдалось значительное ( $p < 0,01$ ) влияние сока морошки на перекисное окисление липидов. У молодых самцов мух значимые ( $p < 0,05$ ) эффекты были обнаружены на первичных продуктах (гидроксипероксида) с желтым соком и на вторичных продуктах (кетодиенах) с красным соком. С последними было установлено значительное ( $p < 0,05$ ) снижение кетодиенов как у молодых, так и у старых мужских особей. Проведенное исследование демонстрирует, что эффекты ягодных антиоксидантов на перекисное окисление липидов легко и быстро тестируются *in vivo* на чувствительной модели дрозофилы [36].

В исследования некоторых ученых показана тенденция к увеличению антиоксидантной активности посредством гидролиза гликозидов, например эллаготанинов (рис. 3), с образованием свободных фенольных остатков [37].

Ряд научных работ посвящен изучению антимикробной активности экстрактов плодов. Большая часть данного эффекта осуществляется за счет органических кислот, основной из которых в плодах *R. chamaemorus* L. является бензойная. Экстракт ягод морошки обладает бактериоста-

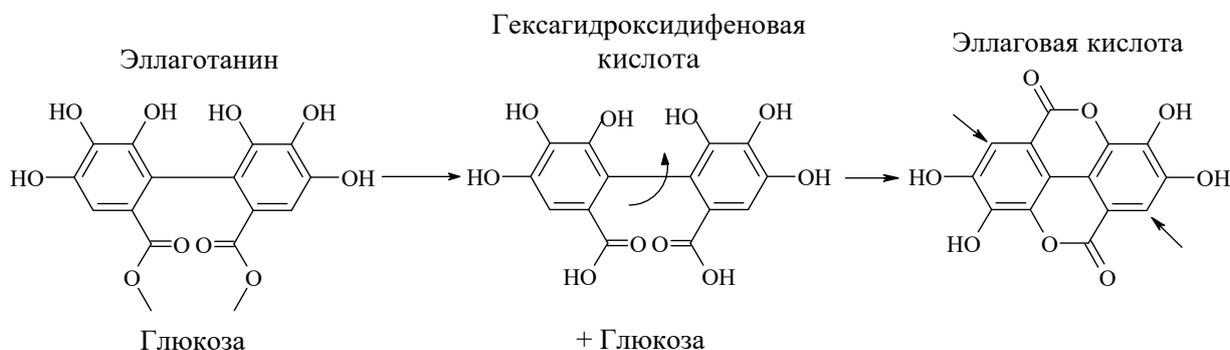


Рис. 3. Реакция гидролиза эллаготанина с образованием эллаговой кислоты

Fig. 3. Hydrolysis reaction of ellagitanin with the formation of the ellagic acid

тическим действием в отношении кишечных бактерий, например *Salmonella* spp. [38]. В целом при исследовании экстрактов ягод продемонстрировано подавление роста грамотрицательных бактерий, в том числе и патогенных штаммов кишечной палочки VTT E-093121 и VTT E-84219 [13]. Наблюдалась также противомикробная активность в отношении *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* и *Campilobacter jejuni*. Некоторый антимикробный эффект оказывали дубильные вещества. Другими эффективными соединениями являлись содержащиеся в морошке флавоны, кверцетин и нарингенин, которые показали свою эффективность в подавлении роста микроорганизмов.

Экстракты листьев *Rubus chamaemorus* L. оказывали эффективное воздействие против *Acanthamoeba* при  $IC_{50} = 0,05$  мг/мл [39].

Также была отмечена антимикробная активность против патогенов человека *S. aureus* DSM 20231, *S. epidermis* ATCC 12228, *B. subtilis* ATCC 9372, *M. luteus* YMBL, *E. coli* ATCC 8739. Экстракты морошки являются лучшими ингибиторами таких бактерий, как *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori* и *Bacillus cereus* [40].

Таким образом, в последнее время число исследований, посвященных изучению биологически активных веществ морошки приземистой, значительно увеличилось. Однако существует достаточно серьезная проблема сохранения и поддержания данного вида на южной границе ареала обитания, что требует научно-практического подхода, направленного на всестороннее изучение качественного и количественного состава вторичных метаболитов и их роли в защите растения от неблагоприятных условий окружающей среды. Такой подход будет способствовать выявлению наиболее приспособленных к климатическим условиям популяций. Биологическая активность экстрактов плодов позволяет рассчитывать на то, что использование сырьевого потенциала данного вида даст возможность наладить производство продуктов питания, в состав которых входят биологически активные добавки и биологически активные вещества функционального назначения.

Следует отметить, что, несмотря на то что при разработке данного направления основной объем исследований, посвященных *R. chamaemorus* L., приходится на изучение плодов, интерес исследователей вызывает также потенциальная ценность листовой массы.

#### Список использованных источников

1. Thiem, B. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review / B. Thiem // Biol. Lett. – 2003. – Vol. 40, N 1. – P. 3–13.
2. Вогулкин, К. Э. Субарктический вид *Rubus chamaemorus* L. на южной и северной границах своего ареала / К. Э. Вогулкин, Н. В. Вогулкина, Л. Н. Шандрикова // Весн. ВГУ. – 2011. – № 6 (66). – С. 26–34.
3. Красная книга Республики Беларусь. Растения. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. ред. : Л. И. Хоружик (пред.) [и др.]. – Минск : Беларус. Энцыкл., 2005. – 456 с.
4. Thiem, B. Malina moroszka *Rubus chamaemorus* L. – występowanie i próba zachowania ginącego gatunku w kulturach *in vitro* / B. Thiem // Chronmy Przyr. Ojcz. – 2001. – N 57. – S. 16–24.
5. Bundesartenschutzverordnung vom 16. Februar 2005 (BGBl. I S. 258, 896), die zuletzt durch Artikel 10 des Gesetzes vom 21. Januar 2013 (BGBl. I S. 95) geändert worden ist. 73 s.
6. Small, E. North American Cornucopia: Top 100 indigenous food plants / E. Small. – Boca Raton : CRC Press, 2013. – 793 p.
7. Петрова, С. Е. Гендерное соотношение и анатомия разнополых особей морошки (*Rubus chamaemorus* L.) в Мурманской области / С. Е. Петрова // Изв. Тимиряз. с.-х. акад. – 2019. – № 6. – С. 130–140.
8. Uleberg, E. Cloudberry breeding in Norway / E. Uleberg, G. Røthe, I. Martinussen // Latvian J. Agronomy. – 2009. – N 12. – P. 122–125.
9. Cloudberries, raw (Alaska Native) nutrition facts and analysis per serving [Electronic resource]. – Mode of access: [https://www.nutritionvalue.org/Cloudberries%2C\\_raw\\_%28Alaska\\_Native%29\\_nutritional\\_value.html](https://www.nutritionvalue.org/Cloudberries%2C_raw_%28Alaska_Native%29_nutritional_value.html). – Date of access: 15.06.2021.
10. Шароглазова, Л. П. Комплексная переработка ягод морошки приземистой (*Rubus chamaemorus*), произрастающей на территории Красноярского края : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.01 / Л. П. Шароглазова. – Красноярск, 2018. – 144 л.

11. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries / M. P. Kähkönen [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2012. – Vol. 60, N 5. – P. 1167–1174. <https://doi.org/10.1021/jf203431g>
12. Fermentation and dry fractionation increase bioactivity of cloudberry (*Rubus chamaemorus*) / R. Puupponen-Pimia [et al.] // Food Chem. – 2016. – N 197, pt. A. – P. 950–958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.061>
13. Johansson, A. Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries / A. Johansson, P. Laakso, H. Kallio // Ztschr. Lebensm. Unters. Forsch. A. – 1997. – Vol. 204, N 4. – P. 300–307. <https://doi.org/10.1007/s002170050081>
14. Johansson, A. Molecular weight distribution of the triacylglycerols of berry seed oils analysed by negative-ion chemical ionization mass spectrometry / A. Johansson, P. Laakso, H. Kallio // Ztschr. Lebensm. Unters. Forsch. A. – 1997. – Vol. 204, N 4. – P. 308–315. <https://doi.org/10.1007/s002170050082>
15. Страх, Я. Л. Анализ жирно-кислотного состава липидов семян морошки приземистой *Rubus chamaemorus* L. / Я. Л. Страх, О. С. Игнатовец, Е. В. Феськова // Биотехнология: взгляд в будущее : материалы VI Междунар. науч.-практ. конф. (Ставрополь, 16 апр. 2020 г.) / Ставропол. гос. мед. ун-т ; отв. ред. В. И. Кошель. – Ставрополь, 2020. – С. 170–173.
16. Страх, Я. Л. Популяционные различия макро-, микроэлементного состава растений и жирнокислотного состава липидов семян морошки приземистой (*Rubus chamaemorus* L.) / Я. Л. Страх, Е. В. Феськова, О. С. Игнатовец // Тр. БГТУ. Сер. 1, Лесное хоз-во, природопользование и переработка возобновляемых ресурсов. – 2021. – № 1 (240). – С. 94–100.
17. Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) cell culture with bioactive substances: Establishment and mass propagation for industrial use / L. Nohynek [et al.] // Eng. Life Sci. – 2014. – Vol. 14, N 6. – P. 667–675. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400069>
18. Pyysalo, T. The influence of heat on the aroma of cloudberries (*Rubus Chamaemorus* L.) / T. Pyysalo, E. Honkanen // Ztschr. Lebensm. Unters. Forsch. – 1977. – Vol. 163, N 1. – P. 25–30. <https://doi.org/10.1007/BF01123552>
19. Получение масла из ягод морошки экстракцией сверхкритическим диоксидом углерода / А. Д. Ивахнов [и др.] // Химия раст. сырья. – 2019. – № 2. – С. 91–97.
20. Круглов, Д. С. Органические кислоты и витамины в плодах морошки приземистой / Д. С. Круглов, Ю. С. Мельник // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. / под ред. М. В. Гаврилина. – Пятигорск, 2010. – Вып. 65. – С. 73–75.
21. Вогулкин, К. Э. Сезонная динамика биохимического состава морошки приземистой (*Rubus chamaemorus* L.), произрастающей на севере Беларуси / К. Э. Вогулкин, Н. В. Вогулкина, Л. Н. Шандрикова // Биологически активные вещества растений – изучение и использование : материалы Междунар. науч. конф. (Минск, 29–31 мая 2013 г.) / науч. ред. В. Н. Решетников. – Минск, 2013. – С. 82–83.
22. Содержание и состав желтых пигментов в плодах морошки и черники в условиях среднетаежной зоны европейской части России / Т. К. Головки [и др.] // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 1–4. – С. 813–816.
23. Lashmanova, K. A. Northern berries as a source of carotenoids / K. A. Lashmanova, O. A. Kuzivanova, O. V. Dymova // Acta Biochim. Pol. – 2012. – Vol. 59, N 1. – P. 133–134.
24. Морфо-физиологические особенности ассимиляционного аппарата листьев *Rubus chamaemorus* на Западном Шпицбергене / Е. А. Марковская [и др.] // Бот. журн. – 2019. – Т. 104, № 11–12. – С. 1740–1752.
25. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland / J. M. Koponen [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – N 55, N 4. – P. 1612–1619. <https://doi.org/10.1021/jf062897a>
26. Chemical composition of ripe fruits of *Rubus chamaemorus* L. grown in different habitats / M. Jaakkola [et al.] // J. Sci. Food Agric. – 2012. – Vol. 92, N 6. – P. 1324–1330. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4705>
27. Määttä-Riihinen, K. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae) / K. R. Määttä-Riihinen, A. Kamal-Eldin, A. R. Törrönen // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52, N 20. – P. 6178–6187. <https://doi.org/10.1021/jf049450r>
28. Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method / G. J. McDougall [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59, N 20. – P. 10860–10868. <https://doi.org/10.1021/jf202083b>
29. Häkkinen, S. H. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique / S. H. Häkkinen, A. R. Törrönen // Food Res. Int. – 2000. – Vol. 33, N 6. – P. 517–524. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7)
30. Hajazimi, E. Simultaneous determination of flavonols and phenolic acids by HPLC-CoulArray in berries common in the Nordic diet / E. Hajazimi, R. Landberg, G. Zamaratskaia // LWT – Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 74. – P. 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.034>
31. National Food and Nutrient Analysis Program. Proceedings of the American Statistical Association (Survey Research Methods). Alexandria, VA, 2001. 1 CD-ROM.
32. Анализ С-гликозидов флавонов и продуктов ступенчатого гидролиза их ацетатов в листьях *Rubus chamaemorus* L. / А. К. Уэйли [и др.] // Химия раст. сырья. – 2021. – № 2. – С. 257–265.
33. Акимов, М. Ю. Роль плодов и ягод в обеспечении человека жизненно важными биологически активными веществами / М. Ю. Акимов, В. Н. Макаров, Е. В. Жбанова // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т. 33, № 2. – С. 56–60.

34. Antioxidant activity of extracts from *Allium schoenoprasum* L. and *Rubus chamaemorus* L. growing in the Komi Republic / K. V. Bezmaternykh [et al.] // Pharmaceut. Chem. J. – 2014. – Vol. 40, N 2. – P. 36–40. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1060-4>
35. The effects of cloudberry fruit extract on *Drosophila melanogaster* lifespan and stress resistance / E. A. Lashmanova [et al.] // Adv. Gerontol. – 2019. – Vol. 9, N 2. – P. 254–260. <https://doi.org/10.1134/s2079057019020127>
36. Rubus fruit juices affect lipid peroxidation in a *Drosophila melanogaster* model *in vivo* / S. V. Mylnikov [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53, N 20. – P. 7728–7733. <https://doi.org/10.1021/jf0513031>
37. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage / K. Aaby [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, N 13. – P. 5156–5166. <https://doi.org/10.1021/jf070467u>
38. Weakening of Salmonella with selected microbial metabolites of berry-derived phenolic compounds and organic acids / H.-L. Alakomi [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55, N 10. – P. 3905–3912. <https://doi.org/10.1021/jf070190y>
39. Derda, M. Plant extracts as natural amoebicidal agents / M. Derda, E. Hadaś, B. Thiem // Parasitol. Res. – 2009. – Vol. 104, N 3. – P. 705–708. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1277-9>
40. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens / L. J. Nohynek [et al.] // Nutr. Cancer. – 2006. – Vol. 54, N 1. – P. 18–32. [https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401\\_4](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401_4)

## References

1. Thiem B. *Rubus chamaemorus* L. – a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review. *Biology Letters*, 2003, vol. 40, no. 1, pp. 3–13.
2. Vogulkin K. E., Vogulkina N. V., Shandrikova L. N. Subarctic species *Rubus chamaemorus* L. on the southern and northern borders of its range. *Vesnik Vitebskaga dzyarzhavnaga universiteta* [Bulletin of Vitebsk State University], 2011, no. 6 (66), pp. 26–34 (in Russian).
3. *Red Book of the Republic of Belarus. Plants. Rare and endangered species of wild plants*. Minsk, Belaruskaya Entsiklapedyya Publ., 2005. 456 p. (in Russian).
4. Thiem B. Malina morozzka *Rubus chamaemorus* L. – występowanie i próba zachowania ginącego gatunku w kulturach *in vitro*. *Chrońmy Przyrodę Ojczyzny*, 2001, no. 57, pp. 16–24.
5. *Federal Species Protection Ordinance of February 16, 2005* (BGBl. I p. 258, 896), which was last amended by Article 10 of the law of January 21, 2013 (BGBl. I p. 95). 73 p.
6. Small E. *North American Cornucopia: Top 100 Indigenous Food Plants*. Boca Raton, CRC Press, 2013. 793 p.
7. Petrova S. E. Gender ratio and anatomy of heterogenous cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) species in the Murmansk region. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* [Proceedings of the Timiryazev agricultural academy], 2019, no. 6, pp. 130–140 (in Russian).
8. Uleberg E., Røthe G., Martinussen I. Cloudberry breeding in Norway. *Latvian Journal of Agronomy*, 2009, no. 12, pp. 122–125.
9. *Cloudberry, raw (Alaska Native) nutrition facts and analysis per serving*. Available at: [https://www.nutritionvalue.org/Cloudberry%2C\\_raw\\_%28Alaska\\_Native%29\\_nutritional\\_value.html](https://www.nutritionvalue.org/Cloudberry%2C_raw_%28Alaska_Native%29_nutritional_value.html) (accessed 15.06.2021).
10. Sharoglazova L. P. *Complex processing of cloudberry berries (Rubus chamaemorus) growing in the Krasnoyarsk Territory*. Ph. D. diss. Krasnoyarsk, 2018. 144 p. (in Russian).
11. Kähkönen M. P., Kylli P., Ollilainen V., Salminen J.-P., Heinonen M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, no. 5, pp. 1167–1174. <https://doi.org/10.1021/jf203431g>
12. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Juvonen R., Kössö T., Truchado P., Westerlund-Wikström B., Leppänen T., Moilanen E., Oksman-Caldentey K.-M. Fermentation and dry fractionation increase bioactivity of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). *Food Chemistry*, 2016, no. 197, pt. A, pp. 950–958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.061>
13. Johansson A., Laakso P., Kallio H. Characterization of seed oils of wild, edible Finnish berries. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 1997, vol. 204, no. 4, pp. 300–307. <https://doi.org/10.1007/s002170050081>
14. Johansson A., Laakso P., Kallio H. Molecular weight distribution of the triacylglycerols of berry seed oils analysed by negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 1997, vol. 204, no. 4, pp. 308–315. <https://doi.org/10.1007/s002170050082>
15. Strakh Ya. L., Ignatovets O. S., Fes'kova E. V. Analysis of the fatty acid composition of lipids in the seeds of cloudberry *Rubus chamaemorus* L. *Biotehnologiya: Vzglyad v budushchee: materialy 6i Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Stavropol', 16 aprelya 2020 goda)* [Biotechnology: A look into the future: materials of the 6th International scientific and practical conference (Stavropol', April 16, 2020)]. Stavropol', 2020, pp. 170–173 (in Russian).
16. Strakh Ya. L., Fes'kova E. V., Ignatovets O. S. Population differences in macro-, microelement composition of plants and fatty acid composition of lipids in cloudberry seeds (*Rubus chamaemorus* L.). *Trudy BGTU. Seriya 1, Lesnoe khozyaistvo, prirodopol'zovanie i pererabotka vozobnovlyaemykh resursov* [Proceedings of BSTU. Series 1, Forestry, nature management and processing of renewable resources], 2021, no. 1, pp. 94–100 (in Russian).
17. Nohynek L., Bailey M., Tähtiharju J., Seppänen-Laakso T., Rischer H., Oksman-Caldentey K.-M., Puupponen-Pimiä R. Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) cell culture with bioactive substances: establishment and mass propagation for industrial use. *Engineering in Life Sciences*, 2014, vol. 14, no. 6, pp. 667–675. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400069>

18. Pyysalo T., Honkanen E. The influence of heat on the aroma of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 1977, vol. 163, no. 1, pp. 25–30. <https://doi.org/10.1007/BF01123552>
19. Ivakhnov A. D., Sadkova K. S., Sobashnikova A. S., Skrebets T. E., Bogdanov M. V. Obtaining oil from cloudberry berries by extraction with supercritical carbon dioxide. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of vegetable raw materials], 2019, no. 2, pp. 91–97 (in Russian).
20. Kruglov D. S., Mel'nik Yu. S. Organic acids and vitamins in the fruits of cloudberry. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoi farmatsevticheskoi produktsii: sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 65* [Development, research and marketing of new pharmaceutical products: a collection of scientific papers. Iss. 65]. Pyatigorsk, 2010, pp. 73–75 (in Russian).
21. Vogulkin K. E., Vogulkina N. V., Shandrikova L. N. Seasonal dynamics of the biochemical composition of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.), growing in the north of Belarus. *Biologicheski aktivnye veshchestva rastenii – izuchenie i ispol'zovanie: materialy mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Minsk, 29–31 maya 2013 goda)* [Biologically active substances of plants – studying and application : proceedings of the International scientific conference (Minsk, May 29–31, 2013)]. Minsk, 2013, pp. 82–83 (in Russian).
22. Golovko T. K., Dymova O. V., Lashmanova E. A., Kuzivanova O. A. The content and composition of yellow pigments in cloudberry and blueberry fruits in the conditions of the middle taiga zone of the European part of Russia. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2011, vol. 13, no. 1–4, pp. 813–816 (in Russian).
23. Lashmanova K. A., Kuzivanova O. A., Dymova O. V. Northern berries as a source of carotenoids. *Acta Biochimica Polonica*, 2012, vol. 59, no. 1, pp. 133–134.
24. Markovskaya E. F., Shmakova N. Yu., Morozova K. V., Ermolaeva O. V. Morpho-physiological features of the assimilation apparatus of leaves of *Rubus chamaemorus* in Western Svalbard. *Botanicheskii zhurnal* [Botanical journal], 2019, vol. 104, no. 11–12, pp. 1740–1752 (in Russian).
25. Koponen J. M., Happonen A. M., Mattila P. H., Törrönen A. R. Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, no. 55, no. 4, pp. 1612–1619. <https://doi.org/10.1021/jf062897a>
26. Jaakkola M., Korpelainen V., Hoppula K., Virtanen V. Chemical composition of ripe fruits of *Rubus chamaemorus* L. grown in different habitats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, vol. 92, no. 6, pp. 1324–1330. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4705>
27. Määttä-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Törrönen A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of fragaria and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no. 20, pp. 6178–6187. <https://doi.org/10.1021/jf049450r>
28. McDougall G. J., Martinussen I., Junntila O., Verrall S., Stewart D. Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 20, pp. 10860–10868. <https://doi.org/10.1021/jf202083b49>
29. Häkkinen S. H., Törrönen A. R. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 2000, vol. 33, no. 6, pp. 517–524. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00086-7)
30. Hajazimi E., Landberg R., Zamaratskaia G. Simultaneous determination of flavonols and phenolic acids by HPLC-CoulArray in berries common in the Nordic diet. *LWT – Food Science and Technology*, 2016, vol. 74, pp. 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.034>
31. *National Food and Nutrient Analysis Program. Proceedings of the American Statistical Association (Survey Research Methods)*. Alexandria, VA, 2001. 1 CD-ROM.
32. Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Serebryakov E. B., Selivanov S. I., Krivoshechekov S. V., Belousov M. V., Proksh P., Luzhanin V. G. Analysis of flavones C-glycosides and stepwise hydrolysis of their acetates in the leaves of *Rubus chamaemorus* L. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of vegetable raw materials], 2021, no. 2, pp. 257–265 (in Russian).
33. Akimov M. Yu., Makarov V. N., Zhanova E. V. The role of fruits and berries in providing a person with vital biologically active substances. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* [Achievements of science and technology of APK], 2019, vol. 33, no. 2, pp. 56–60 (in Russian).
34. Bezmaternykh K. V., Shirshova T. I., Beshlei I. V., Matistov N. V., Smirnova G. V., Oktyabr'skii O. N., Volodin V. Antioxidant activity of extracts from *Allium schoenoprasum* L. and *Rubus chamaemorus* L. growing in the Komi Republic. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2014, vol. 40, no. 2, pp. 36–40. <https://doi.org/10.1007/s11094-014-1060-4>
35. Lashmanova E. A., Kuzivanova O. A., Dymova O. V., Moskalev A. A. The effects of cloudberry fruit extract on *Drosophila melanogaster* lifespan and stress resistance. *Advances in Gerontology*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 254–260. <https://doi.org/10.1134/s2079057019020127>
36. Mylnikov S. V., Kokko H. I., Kärenlampi S. O., Oparina T. I., Davies H. V., Stewart D. Rubus fruit juices affect lipid peroxidation in a *Drosophila melanogaster* model *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no. 20, pp. 7728–7733. <https://doi.org/10.1021/jf0513031>
37. Aaby K., Wrolstad R. E., Ekeberg D., Skrede G. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, vol. 55, no. 13, pp. 5156–5166. <https://doi.org/10.1021/jf070467u>

38. Alakomi H.-L., Puupponen-Pimiä R., Aura A.-M., Helander I. M., Nohynek L., Oksman-Caldentey K.-M., Saarela M. Weakening of *Salmonella* with selected microbial metabolites of berry-derived phenolic compounds and organic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, vol. 55, no. 10, pp. 3905–3912. <https://doi.org/10.1021/jf070190y>

39. Derda M., Hadaś E., Thiem B. Plant extracts as natural amoebicidal agents. *Parasitology Research*, 2009, vol. 104, no. 3, pp. 705–708. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1277-9>

40. Nohynek L. J., Alakomi H. L., Kahkonen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K. M., Puupponen-Pimiä R. H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, 2006, vol. 54, no. 1, pp. 18–32. [https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401\\_4](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401_4)

### Информация об авторах

*Страх Яна Леонидовна* – аспирант. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [y.strakh@gmail.com](mailto:y.strakh@gmail.com)

*Игнатовец Ольга Степановна* – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [Ignatovets@belstu.by](mailto:Ignatovets@belstu.by)

### Information about the authors

*Yana L. Strakh* – Postgraduate student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [y.strakh@gmail.com](mailto:y.strakh@gmail.com)

*Olga S. Ignatovets* – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [Ignatovets@belstu.by](mailto:Ignatovets@belstu.by)

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 615.281.015.21:542.06

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>

Поступила в редакцию 16.11.2021

Received 16.11.2021

**Т. В. Артюх**

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно,  
Республика Беларусь*

## **ИЗУЧЕНИЕ СИНЕРГИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА «ШАХМАТНОЙ ДОСКИ» И АНАЛИЗА «ВРЕМЕНИ УНИЧТОЖЕНИЯ»**

**Аннотация.** Использование комбинаций антибиотиков является перспективным направлением антибактериальной терапии инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами. Основной целью комбинированной антибиотикотерапии является достижение синергидного эффекта и расширение спектра антибактериальной активности в отношении мультирезистентных микроорганизмов. В связи с наличием у бактерий разнообразных механизмов резистентности даже к препаратам одной группы микробиологическая эффективность комбинаций антибиотиков трудно прогнозируема. Поэтому для подбора эффективных комбинаций антибиотиков требуется проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного пациента.

В настоящее время в Республике Беларусь комбинированная антибиотикотерапия назначается эмпирически, а в случае ее клинической неэффективности проводится замена препаратов. Одной из причин ограниченного тестирования, несмотря на доступность питательных сред и диагностических материалов, является отсутствие адаптированных для локальных микробиологических лабораторий нормативно-технических методик выявления синергии.

Цель настоящей работы – анализ современных методов исследования эффектов синергии антибактериальных препаратов и возможности их внедрения в практическую медицину.

В результате поиска публикаций в базе данных PubMed на тему повышения антибактериального эффекта антибиотиков по запросу «checkerboard method» and «time-kill» за период с 2016 по 2021 г. было найдено 947 результатов, при этом отмечалась тенденция к росту числа этих исследований.

Метод «шахматной доски» и анализ «time-kill» являются наиболее распространенными и надежными тестами *in vitro*, которые отражают эффекты, получаемые при комбинации антибиотиков как друг с другом, так и с другими соединениями.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, комбинации антибиотиков, синергия, метод «шахматной доски», анализ «time-kill»

**Для цитирования:** Артюх, Т. В. Изучение синергии антибактериальных препаратов с использованием метода «шахматной доски» и анализа «времени уничтожения» / Т. В. Артюх // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2022. – Т. 67, № 3. – С. 332–342. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>

**Tatiana V. Artyukh**

*Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

## **STUDYING SYNERGY OF ANTIBACTERIAL DRUGS USING THE “CHECKERBOARD” METHOD AND THE “TIME-KILL” ANALYSIS**

**Abstract.** The use of combinations of antibiotics is a promising area of antibiotic therapy of bacterial infections caused by antibiotic-resistant strains. The main goal of combined antibiotic therapy is to achieve a synergistic effect and to expand a spectrum of antibacterial activity against multi-resistant microorganisms. Due to the presence of various mechanisms of resistance in bacteria, even to drugs of the same group, the microbiological efficacy of antibiotic combinations is difficult to predict. Therefore, to select effective combinations of antibiotics, it is required to conduct a microbiological testing of isolates isolated from a particular patient.

Currently, in the Republic of Belarus, the appointment of combined antibiotic therapy is carried out empirically, and in the event of its clinical ineffectiveness, the drugs are replaced. One of the reasons for a limited testing, with the availability of culture media and diagnostic materials, is the lack of regulatory and technical methods for identifying synergy adapted to local microbiological laboratories.

The purpose of this publication was to analyze the literature data illustrating the relevance of analyzing the methods for studying the effects of synergy of antibacterial drugs and the possibility of their introduction into practical medicine.

As a result of a search for publications in the PubMed database on the topic of increasing the antibacterial effect of antibiotics on the request the “checkerboard” method and the “time-kill” analysis for the period from 2016 to 2021, 947 results were found with an upward trend in research.

“Checkerboard” and “time-kill” assays are the most common, reliable *in vitro* tests that reflect the effects of antibiotic combinations and the effects of antibiotic combinations with other compounds.

**Keywords:** antibiotic resistance, antibiotic combinations, synergy, “checkerboard method”, “time-kill” analysis

**For citation:** Artyukh T. V. Studying synergy of antibacterial drugs using the “checkerboard” method and the “time-kill” analysis. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 332–342 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-3-332-342>

**Введение.** В течение длительного времени эффекты синергии антибактериальных препаратов и механизмы, лежащие в их основе, оставались неизученными. Началу исследований синергии способствовало распространение множественной лекарственной устойчивости вследствие появления возбудителей, с трудом поддающихся лечению традиционными методами [1].

В настоящее время в сфере здравоохранения встречаются устойчивые штаммы следующих микроорганизмов: метициллин- и ванкомицин-устойчивый *Staphylococcus aureus*; группа микробов, имеющих бета-лактамазу (семейство *Enterobacteriaceae* и др.); мультирезистентная *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida*; карбапенем-устойчивый *Acinetobacter*; ванкомицин-устойчивые *Enterococcus*; *Streptococcus* группы А, устойчивый к эритромицину и другим препаратам [2]. Согласно отчету «об угрозах дополнительной реальности», ежегодно в США выявляют более 2,8 млн устойчивых к антибиотикам инфекций, в результате которых умирают более 35 тыс. человек. Кроме того, затраты на лечение инфекций могут достигать 4,5 млрд долларов в год [3]. Доступность, широкое и необоснованное применение антибиотиков привело к тому, что антибиотикорезистентность стала глобальной проблемой, которая указывает на необходимость разработки новых препаратов, активных в отношении резистентных микроорганизмов, или мониторинга уже известных на наличие синергетических антибактериальных эффектов.

Известно, что комбинации антибактериальных средств могут повысить эффективность антибиотиков и снизить устойчивость к антибактериальным препаратам за счет независимых, синергических эффектов. Комбинированная терапия широко используется для лечения рака, вирусных и микобактериальных инфекций. Однако по причине сложности утверждения регулируемыми органами антибактериальных препаратов комбинации данных веществ только сейчас включены в общую стратегию лечения бактериальных инфекций [4].

Для понимания эффекта синергии необходимо ввести термин «аддитивность», означающий отсутствие взаимодействия или инертность. Именно проблема математического определения аддитивности была предметом споров среди ведущих исследователей этой темы в течение последнего столетия. Любое отклонение от аддитивности рассматривается как синергизм (супераддитивность, потенцирование, коализм) или антагонизм (субаддитивный эффект, отрицательная синергия). Эффекты антагонизма интересуют исследователей (за исключением токсикологов) в меньшей степени. Синергия же вызывает особый интерес, поскольку подразумевает достижение терапевтического эффекта при использовании меньшего количества компонентов препарата, а также снижение числа побочных эффектов [4].

Наибольшую ясность в формулировку термина «эффект синергии» внес М. С. Berenbaum (1989 г.). Предложенный им изоболический метод включает модели как *in vitro*, так и на животных. Метод позволяет наглядно продемонстрировать взаимодействие доз отдельных компонентов (рис. 1) [5].

Согласно результатам тематических исследований, выявлены следующие механизмы достижения синергии антибактериальных препаратов [6]:

1. *Фармакокинетические или физико-химические эффекты, связанные с улучшением растворимости, скоростью резорбции и повышением биодоступности.* Для преодоления снижения биодоступности рифампицина в сочетании с изониазидом разработаны энтеросолюбильные микрочастицы для контролируемого высвобождения данных препаратов, что повысило их биодоступность в 9 раз [7].

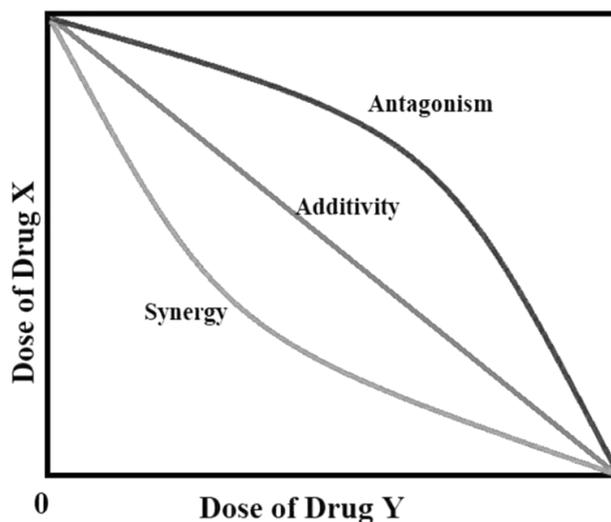


Рис. 1. Изобола различных видов взаимодействия веществ: отсутствие взаимодействия – аддитивный эффект; антагонизм – негативное взаимодействие; синергия – позитивное взаимодействие [5]

Fig. 1. Isobol of various types of interaction of substances: lack of interaction – additive effect; antagonism – negative interaction; synergy – positive interaction [5]

2. *Достижение синергии через многоцелевые эффекты.* Основные цели воздействия лекарственных препаратов – ферменты, субстраты, метаболиты, рецепторы, ионные каналы, транспортные белки, ДНК, РНК, рибосомы, моноклональные антитела и физико-химические механизмы. Эффект синергии возникает, если действие отдельных составляющих веществ в смеси направлено на разные цели-мишени. Примером многоцелевого принципа терапии может служить препарат Иберогаст, в состав которого входит 9 лекарственных растений. В зависимости от исходного состояния препарат оказывает двойное действие на желудочно-кишечный тракт: с одной стороны – расслабляет, с другой – повышает тонус [8].

3. *Устранение или нейтрализация неблагоприятных воздействий содержащихся в препарате или добавленных к нему веществ в целях повышения его эффективности.* Назначение пробиотиков в комплексной терапии антибиотиками широкого спектра действия вполне оправданно, поскольку штаммы, отличающиеся устойчивостью к антибиотикам, способствуют восстановлению нормальной кишечной флоры. Такой подход дает возможность значительно уменьшить число и степень тяжести возможных осложнений [9].

4. *Блокирование механизмов резистентности бактерий.* Примером преодоления антибиотикорезистентности является использование ингибиторов бета-лактамаз в сочетании с пеницилинами или цефалоспорином в составе комбинированных препаратов. Ингибиторы бета-лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам) обеспечивают инактивацию микробных ферментов до того, как последние успевают расщепить –С–N-связь в структуре антибиотика. Также показано, что синергия нитрофуран/дезоксихолат/ванкомицин против энтеробактерий реализуется через блокаду отводящих насосов грамотрицательных бактерий [10].

Однако в настоящее время существует множество примеров синергического взаимодействия веществ, механизмы действия которых еще научно не обоснованы (изучение их природы требует проведения дополнительных исследований) [11, 12].

Началу исследований синергии в практических лабораториях способствовало применение новых методов в молекулярной биологии и аналитической химии. В то же время большинство современных методик определения эффективности антибактериальных препаратов опирается на классические показатели минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК). МИК определяется как самая низкая концентрация противомикробного агента, которая предотвращает видимый рост микроорганизмов, МБК – как самая низкая концентрация антимикробного агента, необходимая для полного уничтожения микроорганизмов (уменьшение исходного посевного материала на 99,9 % за 18–24 ч).

В результате поиска публикаций в базе данных PubMed на тему повышения антибактериального эффекта антибиотиков по запросу «synergy of antibiotics» за период с 2016 по 2021 г. было найдено 1537 результатов. Фильтр-клинические исследования за период с 2019 г. показали, что метод «шахматной доски» и анализ на антимикробную эффективность под названием «time-kill» (определение скорости гибели бактериальных клеток или анализ «времени уничтожения») являются наиболее часто используемыми количественными методиками в измерении эффектов антибактериальной синергии.

**Метод «шахматной доски».** Измерение синергии с помощью метода «шахматной доски» используется для определения влияния на антимикробную эффективность комбинации антибиотиков по сравнению с их индивидуальной активностью. Это сравнение представлено как значение индекса фракционной ингибирующей концентрации (ФИК). Значение индекса ФИК учитывает комбинацию антибиотиков, которая дает наибольшее отклонение от МИК отдельного антибиотика. Для количественной оценки взаимодействий между тестируемыми антибиотиками (индекс ФИК) используется следующее уравнение [13]:

$$\sum \text{ФИК} = \frac{\text{МИК}_{\text{Ac}}}{\text{МИК}_{\text{A}}} + \frac{\text{МИК}_{\text{Bc}}}{\text{МИК}_{\text{B}}},$$

где  $\text{МИК}_{\text{Ac}}$  – минимальная подавляющая концентрация первого антибиотика, взятого в сочетании со вторым антибиотиком или иным веществом, мкг/мл;  $\text{МИК}_{\text{A}}$  – минимальная подавляющая концентрация первого антибиотика, взятого как монопрепарат, мкг/мл;  $\text{МИК}_{\text{Bc}}$  – минимальная подавляющая концентрация второго антибиотика или иного вещества, взятого в сочетании с первым антибиотиком, мкг/мл;  $\text{МИК}_{\text{B}}$  – минимальная подавляющая концентрация второго антибиотика или иного вещества, мкг/мл.

Затем значение индекса ФИК используется для категоризации взаимодействия двух протестированных антибиотиков. Авторы метода предлагают следующую трактовку индекса ФИК [13]:

*синергия* – комбинация соединений увеличивает ингибирующую активность (снижение МИК) одного или обоих соединений, чем соединения по отдельности ( $\text{ФИК} < 0,5$ );

*отсутствие взаимодействия* – комбинация не имеет увеличения ингибирующей активности из-за аддитивного эффекта обоих соединений вместе ( $\text{ФИК} = 0,5-4$ );

*антагонизм* – комбинация соединений увеличивает МИК или снижает активность отдельных соединений ( $\text{ФИК} > 4$ ).

Выполнение метода «шахматной доски» возможно в автоматизированном и ручном варианте. Ручной режим требует кропотливого расчета разведений исследуемых веществ и подвержен ошибкам в большей мере, чем автоматизированный. Исследования проводят в 96-луночных полистироловых планшетах. Схема анализа представлена на рис. 2. Готовят необходимые концентрации рабочих растворов исследуемых веществ А и В с известными для исследуемого штамма МИК. В лунки стерильного плоскодонного планшета слева направо вносят разведения веществ А для создания двукратного серийного убывающего градиента концентрации в диапазоне  $8-0,125$  МИК. В лунках по направлению сверху вниз создают двукратный серийный убывающий градиент концентрации для вещества В в том же диапазоне. Заданные концентрации, полученные на бульоне Мюллера–Хинтона, вносятся в ячейки, после чего планшет инокулируют суспензией исследуемой культуры [14]. Контроли используют для регистрации значений МИК тестируемых соединений, а ингибирующие концентрации соединений А и В позволяют рассчитывать значения ФИК с применением указанной выше формулы.

После инкубации производят учет результатов, сравнивая опытные лунки с контрольными: лунка Н2 для вещества А –  $\text{МИК}_{\text{A}} = 128$  мкг/мл, лунка В12 для вещества В –  $\text{МИК}_{\text{B}} = 4$  мкг/мл. Разведения в лунках с прозрачным содержимым принимают за МИК комбинаций исследуемых веществ и рассчитывают ФИК. Расчет ФИК производят по прозрачным лункам, находящимся вблизи диагонали Н1 ... А12. Таким образом,  $\text{МИК}_{\text{Ac}}$  вещества А в эффективном сочетании с веществом В составила 8 мкг/мл, а  $\text{МИК}_{\text{Bc}}$  вещества В в эффективном сочетании с веществом А – 1 мкг/мл (рис. 2).

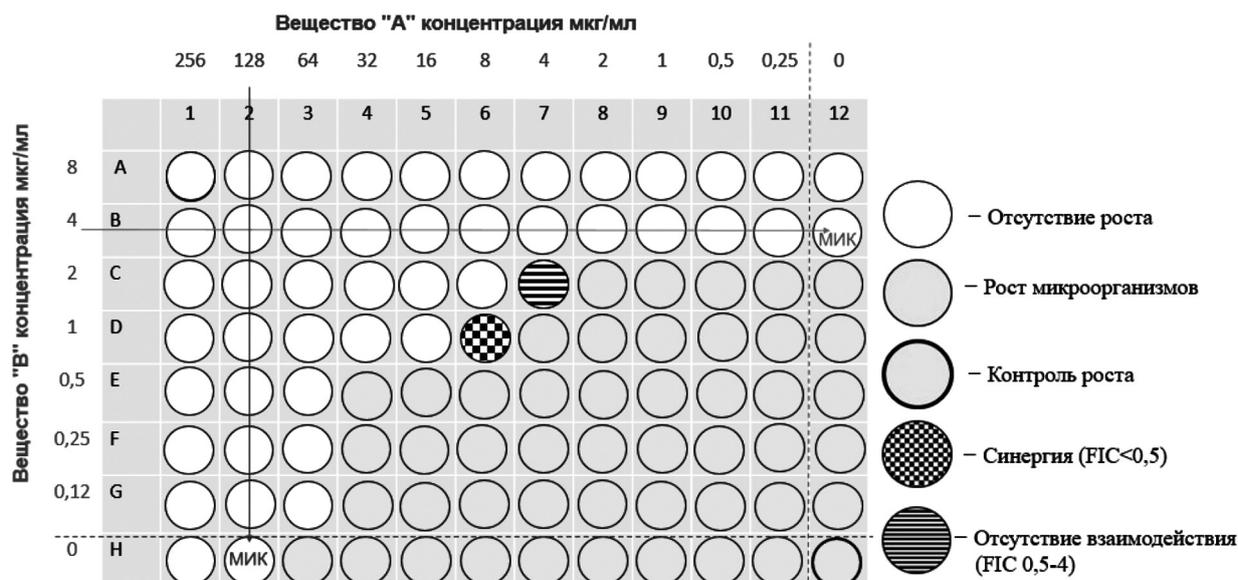


Рис. 2. Схема применения метода «шахматной доски»

Fig. 2. Scheme of the use of the “checkerboard” method

На основании значения ФИК комбинации соединений (лунки, проявившие ингибирующий эффект) оценивают на синергизм, аддитивность или антагонизм [14]: ФИК лунки D6 =  $8/128 + 1/4 = 0,31$  (синергидный эффект), ФИК лунки C7 =  $4/128 + 2/4 = 0,53$  (отсутствие взаимодействия).

Микробиологическое заключение проведенного исследования оформляют с указанием индивидуальных значений МИК антибиотиков, значения индекса ФИК, интерпретации результата взаимодействия для комбинации антибиотиков (синергизм, отсутствие взаимодействия или антагонизм).

Комбинированное бактерицидное тестирование получило широкое применение с начала XXI в. По результатам исследования 119 изолятов *V. septicus*, выделенных у пациентов с муковисцидозом, 50 % были устойчивы ко всем протестированным антибиотикам, 8 % – ко всем комбинациям антибиотиков с двумя препаратами. Тройные комбинации антибиотиков, которые содержали тобрамицин, меропенем и дополнительный антибиотик, были наиболее эффективными в отношении 81–93 % устойчивых штаммов *V. septicus* [15]. Еще одно рандомизированное исследование показало, что комбинированная антибактериальная терапия  $\beta$ -лактамом и аминогликозидом превосходит монотерапию антибиотиками у пациентов с обострениями муковисцидоза, которые колонизированы мультирезистентными штаммами *P. aeruginosa* [16]. Однако относительно пациентов с муковисцидозом нет достаточных доказательств того, что сложное рутинное использование тестирования комбинаций антибиотиков улучшает клинические результаты [17].

С помощью усовершенствованного метода «шахматной доски» CombiANT было продемонстрировано, что комбинации триметоприм + нитрофурантоин и триметоприм + мециллинам показывают синергизм, но только для определенных изолятов *E. coli*, тогда как комбинации мециллинам + нитрофурантоин показывают антагонистические взаимодействия для всех протестированных штаммов *E. coli* [18].

Недавно разработанный ингибитор  $\beta$ -лактамаз – таниборбактам тестировали с помощью метода «шахматной доски» в комбинации с цефепимом на 129 изолятах *Enterobacterales*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра. Комбинация цефепим + таниборбактам продемонстрировала потенцированную активность в отношении изолятов, восстановив чувствительность всех энтеробактерий и 64 % изолятов *P. aeruginosa* [19].

Одним из немногих доступных вариантов борьбы с карбапенем-резистентными штаммами является колистин. Однако во всем мире наблюдается снижение антибактериальной активности данного препарата-резерва. В связи с этим проводятся исследования по оптимизации эффективных

антибактериальных комбинаций с использованием метода «шахматной доски». По результатам исследований синергизм тигециклина в сочетании с амикацином или гентамицином составил 8,2 %. Аддитивная активность наблюдалась в 75,5 % изолятов для тигециклин + амикацин и в 69,4 % изолятов для тигециклин + гентамицин, при этом антагонизма не наблюдалось. На основании полученных данных о фракционных ингибирующих концентрациях можно улучшить оптимальное дозирование антибиотиков. Общая рекомендуемая доза комбинированных схем включает 200 мг тигециклина и 25 мг/кг амикацина или 7 мг/кг гентамицина, затем 100 мг тигециклина каждые 12 ч и 15 мг/кг амикацина или 5 мг/кг гентамицина каждые 24 ч. Таким образом, тигециклин в сочетании с аминогликозидами может быть потенциальным режимом против карбапенем-резистентных штаммов [20].

Метод «шахматной доски» направлен на выявление синергидного эффекта при сочетанном воздействии антибиотиков на бактериальную клетку при лечении заболеваний, вызванных микроорганизмами с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью. Высокой резистентностью к антибиотикам обладают также бактерии, склонные к образованию микробных биопленок. Известно, что МИК антибиотиков в отношении бактерий в составе биопленок может в тысячи раз превышать этот показатель для планктонных форм бактерий [21]. Таким образом, метод «шахматной доски» перспективен для мониторинга эффективности комбинаций антибиотиков на разрушение и элиминацию микробных биопленок.

**Анализ «time-kill»** относят к современным методам диагностики. Первые исследования с использованием данного метода описаны в 1986 г. Krogstad и Moellering. Метод основан на количественной оценке антимикробной активности после подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованных средах при высеве разведений опытных образцов. Измерение синергии с помощью анализа «time-kill» используется для отражения временной характеристики воздействия антибактериальных препаратов. Патогенные микроорганизмы могут переживать антибиотическую атаку, проявляя свойства персистенции, при этом инфекционный процесс продолжается. В связи с этим важно определение зависимости между бактерицидным действием антимикробных средств и временем экспозиции их воздействия на микроорганизм не в одной временной точке – через 24 ч инкубации, а в нескольких – через 4, 8, 12 и 24 ч. Это осуществляется путем подсчета жизнеспособности бактериальных штаммов через разные временные интервалы.

Микробиологическое заключение, результат исследования визуализируются с помощью графика (так называемая кривая зависимости «время – летальное действие») (рис. 3) [22]. Штаммы

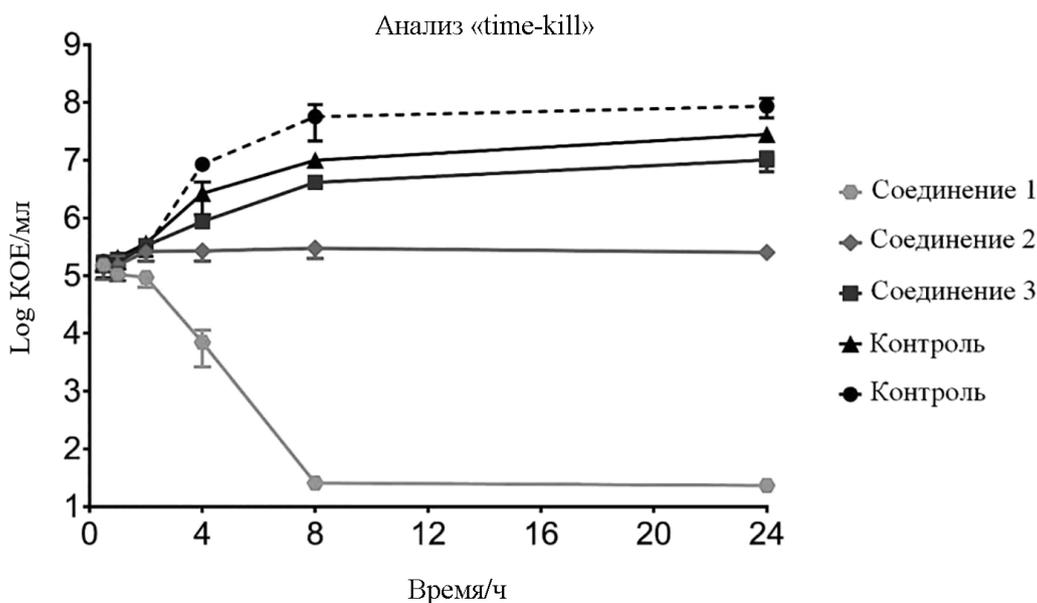


Рис. 3. Кривая зависимости «время – летальное действие»

Fig. 3. Dependency curve “time-kill”

бактерий, как правило, наносят на ось  $Y$  в логарифмическом масштабе, соответствующее время – на ось  $X$  арифметической шкалы.

В этом примере (рис. 3) соединение 1 проявляет бактерицидный эффект, снижая исходный логарифм КОЕ/мл более чем на три логарифма. Соединение 2 проявляет бактериостатический эффект, поскольку  $\log$  КОЕ/мл с течением времени остается таким же, как и при исходной концентрации  $\log$  КОЕ/мл. Соединение 3 проявляет слабый противомикробный эффект, так как бактерии в присутствии этого соединения со временем растут до уровня, аналогичного контрольному.

С помощью анализа «time-kill» проведено моделирование для оценки противомикробных препаратов против *N. gonorrhoeae*. Исследование показало, что цефтриаксон, цефиксим и бензилпенициллин проявляют зависящие от времени бактерицидные свойства, что позволяет улучшить стратегии дозирования для лечения гонореи [23].

В экспериментах с анализом «time-kill» против *K. pneumoniae*, продуцирующей карбапенемазы, изучены эффекты имипенема и дорипенема. Показано, что их активность в присутствии релебактама значимо не различается. Максимальное снижение числа бактерий ( $2\log$ – $2,5\log$  КОЕ/мл) наблюдалось при схемах, содержащих 30 мг/л имипенема или дорипенема. Также выявлено снижение количества бактерий в первые 8 ч в зависимости от концентрации, что позволяет оптимизировать режим дозирования [24].

Помимо определения толерантности к бактерицидной концентрации антибиотиков анализ «time-kill» позволяет охарактеризовать эффекты синергии между противомикробными средствами с точки зрения скорости их действия. Также с помощью данного метода, в отличие от описанного выше, возможно изучение синергии антибиотиков с веществами, которые самостоятельно не проявляют бактерицидных и бактериостатических эффектов, но в комбинации с антибиотиком усиливают его антибактериальный эффект. Анализ применяется для оценки эффективности комбинаций антисептических средств местного действия и прогнозирования их дозы, модуляции резистентности на образование биопленки и определения времени гибели бактерий с множественной лекарственной резистентностью в зависимости от комбинаций антибиотиков.

В первых (1987 г.) публикациях по изучению согласованности результатов применения описанных выше методов («шахматной доски» и «time-kill») не наблюдается полного соответствия. Так, фракционные ингибирующие и бактерицидные концентрации при проведении исследований с применением метода «шахматной доски» сравнивали с результатами «time-kill» анализа и наоборот. Общее согласие МИК и МБК составило 39,4 и 40,9 % соответственно [25]. Данное исследование показывает отсутствие согласованности между методами в демонстрации синергизма антимикробных препаратов. Однако со временем показатели согласованности достигли 88 %, что связывают с совершенствованием авторских методик и появлением автоматизированных вариантов их исполнения.

Динамика устойчивости к антибактериальным препаратам растет из года в год. К 2019 г. распространенность инвазивных штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых к карбапенемазам, в Беларуси достигала 75 % (данные объединенного проекта EARS-Net и CAESAR, 2019) [26].

Протоколы, выпущенные в первую волну COVID-19, предусматривали широкое назначение антибиотиков, что неоправданно способствовало селекции устойчивости. Результаты большого метаанализа показывают, что частота бактериальных ко-инфекций среди пациентов с COVID-19 составила 7 %, антимикробную терапию при этом получали 72 % [27]. Помимо того, освещение средствами массовой информации результатов исследований привело к необоснованному предположению, что комбинация азитромицина с гидроксихлорохином эффективна при COVID-19. Несмотря на хорошо известные побочные эффекты гидроксихлорохина на сердечно-сосудистую систему и тот факт, что предварительные данные не показали эффективности комбинации для лечения больных COVID-19, это предположение привело к чрезмерному использованию азитромицина в комбинации с гидроксихлорохином. Тактика использования антибиотиков в лечении больных COVID-19 неизбежно ведет к росту вторичной лекарственной устойчивости потенциально патогенных микроорганизмов к часто назначаемым антибиотикам [28]. Так, штаммы

*K. pneumoniae*, выделенные от пациентов с COVID-19, характеризовались множественной устойчивостью к антибиотикам, в том числе устойчивостью высокого уровня к колистину. Распространение подобных штаммов в дальнейшем может значительно затруднить проведение этиотропной терапии [29].

**Заключение.** Классический синтез новых антибиотиков не может сдерживать появление и распространение множественной лекарственной устойчивости. В связи с этим необходимы дополнительные стратегии для расширения терапевтических возможностей за счет синергетических комбинаций веществ, проявляющих антибактериальные эффекты. Недавно проведенный метаанализ, включавший 2841 респондента, выявил более низкую смертность среди пациентов, получавших комбинированную терапию, по сравнению с пациентами, получавшими монотерапию [30]. Такой подход выглядит многообещающим в преодолении резистентности и может быть реализован через использование методов тестирования бактерицидности в различных комбинациях.

Метод «шахматной доски» и анализ «time-kill», а также их модификации являются наиболее распространенными и надежными тестами *in vitro*, которые отражают эффекты комбинаций антибиотиков. Автоматизированный режим метода «шахматной доски» является высокопроизводительным скринингом, а анализ «времени уничтожения» показывает дополнительные характеристики синергетических эффектов.

Поскольку в настоящее время назначение комбинированной антибиотикотерапии проводится эмпирически и в случае ее клинической неэффективности необходима микробиологическая верификация диагноза с последующим рациональным выбором этиотропного лечения, описанные методы исследования синергии могут быть адаптированы для микробиологических лабораторий с целью перехода от исследовательского тестирования комбинаций антибиотиков к рациональному, клинически значимому. Это позволит повысить компетентность специалистов и проводить микробиологическое тестирование изолятов, выделенных от конкретного пациента, в лабораториях любой оснащенности с минимальными экономическими затратами.

### Список использованных источников

1. Eliopoulos, G. M. Antibiotic combinations: Should they be tested? / G. M. Eliopoulos, S. T. Eliopoulos // Clin. Microbil. Rev. – 1988. – Vol. 1, N 2. – P. 139–156. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.139>
2. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains / D. V. Tapalski [et al.] // Rus. Clin. Lab. Diagn. – 2021. – Vol. 66, N 5. – P. 304–309. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309>
3. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States / R. E. Nelson [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 72, N 1. – P. 17–26. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1581>
4. The future of antibiotics begins with discovering new combinations / M. Zhu [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2021. – Vol. 1496, N 1. – P. 82–96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14649>
5. Ma, J. Current methods for quantifying drug synergism / J. Ma, A. Motsinger-Reif // Protein Bioinform. – 2019. – Vol. 1, N 2. – P. 43–48.
6. Вагнер, Х. Исследование синергии: создание нового поколения фитопрепаратов / Х. Вагнер, Г. Ульрих-Мерцених // Рус. мед. журн. Мед. обозрение. – 2016. – Т. 24, № 3. – С. 183–189.
7. Duarte, F. Gastric-resistant isoniazid pellets reduced degradation of rifampicin in acidic medium [Electronic resource] / F. Duarte [et al.] // Braz. J. Pharm. Sci. – 2014. – Vol. 50, N 4. – P. 749–755. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400010>
8. Король, Л. А. Иберогаст – эффективная фитотерапия функциональных заболеваний желудочнокишечного тракта / Л. А. Король, С. А. Скатков // Терапия. – 2016. – № 5. – С. 88–95.
9. Gut-brain-microbiota axis: antibiotics and functional gastrointestinal disorders / T. Karakan [et al.] // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, N 2. – Art. 389. <https://doi.org/10.3390/nu13020389>
10. *In vitro* combined inhibitory activities of  $\beta$ -Lactam antibiotics and clavulanic acid against blaKPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* / M. Peng [et al.] // Infect. Drug Resist. – 2021. – Vol. 14. – P. 361–368. <https://doi.org/10.2147/IDR.S292612>
11. Антимикробная и противогрибковая активность экстрактов лишайников, распространенных на территории Беларуси / Д. В. Тапальский [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2017. – № 2. – С. 60–65.
12. Синергидное действие катионного пептида хоминина и нового дезинфектанта на основе изохинолина на образование биопленок полирезистентных стафилококков / Л. И. Кононова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65. – № 5–6. – С. 11–18.

13. Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them / F. C. Odds // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2003. – Vol. 52, N 1. – P. 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
14. Тапальский, Д. В. Методы определения чувствительности к комбинациям антибиотиков грамотрицательных бактерий с экстремальной и полной антибиотикорезистентностью : инструкция по применению / Д. В. Тапальский, Л. В. Лагун. – Гомель : Гомел. гос. мед. ун-т, 2017. – 27 с.
15. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia* / S. D. Aaron [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 4, N 1. – P. 1206–1212. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9907147>
16. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* / B. J. Lang [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 162, N 6. – P. 2241–2245. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.2005018>
17. Antimicrobial synergy testing: comparing the tobramycin and ceftazidime gradient diffusion methodology used in assessing synergy in cystic fibrosis-derived multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* / I. N. Okoliegbe [et al.] // *Antibiotics.* – 2021. – Vol. 10, N 8. – Art. 967. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080967>
18. ComBIANT: Antibiotic interaction testing made easy / N. Fatsis-Kavalopoulos [et al.] // *PLoS Biol.* – 2020. – Vol. 18, N 9. – P. e3000856. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000856>
19. Activity of cefepime in combination with the novel  $\beta$ -lactamase inhibitor taniborbactam (VNRX-5133) against extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates in *in vitro* checkerboard assays / W. Kloezen [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2021. – Vol. 65, N 4. – P. e02338-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02338-20>
20. Тапальский, Д. В. Чувствительность к комбинациям антибиотиков, продуцирующих карбапенемазы нозокомиальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Беларуси / Д. В. Тапальский // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 182–191.
21. Артюх, Т. В. Особенности резистентности клинических изолятов *E. coli* и *C. albicans*, образующих биопленку / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, О. Б. Островская // *Вестн. ВГМУ.* – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 46–54.
22. Адамович, Т. Г. Методы изучения антимикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro* / Т. Г. Адамович, И. А. Гаврилова, Е. Ю. Кирильчик // *Современные технологии в медицинском образовании : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Белорус. гос. мед. ун-та, Минск, 1–5 нояб. 2021 г. / Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол. : С. П. Рубникович [и др.]. – Минск, 2021. – С. 1540–1543.*
23. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae* / S. Foerster [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2016. – Vol. 16. – Art. 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0838-9>
24. Predicting the effects of Carbapenem/Carbapenemase inhibitor combinations against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in time-kill experiments: alternative versus traditional approaches to MIC determination / A. V. Filimonova [et al.] // *Antibiotics.* – 2021. – Vol. 10, N 12. – Art. 1520. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121520>
25. Chan, E. L. Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas* / T. L. Chen, R. J. Zabransky // *Microb. Drug Resist.* – 1987. – Vol. 6, N 2. – P. 157–164. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90101-5)
26. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Европе – 2019 г. [Электронный ресурс] // Ежегодный доклад Европейского Регионального бюро ВОЗ. – Режим доступа: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf). – Дата доступа: 13.01.2022.
27. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis / L. Lansbury [et al.] // *J. Infect.* – 2020. – Vol. 81, N 2. – P. 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
28. Синопальников, А. И. Пандемия COVID-19 – «пандемия» антибактериальной терапии / А. И. Синопальников // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2021. – Т. 23, № 1. – С. 5–15.
29. Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae* на фоне пандемии COVID-19: опыт многопрофильного стационара / Д. В. Тапальский [и др.] // *Инфекц. болезни: новости, мнения, обучение.* – 2021. – Т. 10, № 3. – С. 15–22.
30. Evaluation of the therapeutic outcomes of antibiotic regimen against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis / C. Y. Effah [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 597907. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.597907>

## References

1. Eliopoulos G. M., Eliopoulos C. T. Antibiotic combinations: should they be tested? *Clinical Microbiology Reviews*, 1988, vol. 1, no. 2, pp. 139–156. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.139>
2. Tapalski D. V., Timoshkova E. V., Petrovskaya T. A., Osipkina O. V., Karpov I. A. Microbiological efficiency of the combinations of two carbapenems against antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, vol. 23, no. 5, pp. 304–309. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-5-304-309>
3. Nelson R. E., Hatfield K. M., Wolford H., Samore M. H., Scott R. D., Reddy S. C., Olubajo B., Paul P., Jernigan J. A., Baggs J. National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, vol. 29, no. 72, pp. 17–26. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1581>
4. Zhu M., Tse M. W., Weller J., Chen J., Blainey P. C. The future of antibiotics begins with discovering new combinations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2021, vol. 1496, no. 1, pp. 82–96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14649>
5. Ma J., Motsinger-Reif A. Current methods for quantifying drug synergism. *Protein Bioinformatics*, 2019, vol. 1, no. 2, pp. 43–48.

6. Vagner Kh., Ul'rikh-Mertsenikh G. Synergy research: creating a new generation of herbal medicines. *Russkii meditsinskii zhurnal. Meditsinskoe obozrenie* [Russian medical journal. Medical review], 2016, vol. 24, no. 3, pp. 183–189 (in Russian).
7. Frejre F. D., Kamara M. B., Dantas M. G., Soares Aragao S. F., de Lima i Moura T. F. A., Rafin F. N. Gastric-resistant isoniazid pellets reduced degradation of rifampicin in acidic medium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 50, no. 4, pp. 749–755. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000400010>
8. Korol' L. A., Skatkov S. A. Iberogast – effective herbal medicine for functional diseases of the gastrointestinal tract. *Terapiya* [Therapy], 2016, no. 5, pp. 88–95 (in Russian).
9. Karakan T., Ozkul C., Küpeli Akkol E., Bilici S., Sobarzo-Sánchez E., Capasso R. Gut-brain-microbiota axis: antibiotics and functional gastrointestinal disorders. *Nutrients*, 2021, vol. 13, no. 2, art. 389. <https://doi.org/10.3390/nu13020389>
10. Peng M., Han R., Guo Y., Zheng Y., Yang F., Xu X., Hu F. *In vitro* combined inhibitory activities of  $\beta$ -lactam antibiotics and clavulanic acid against blaKPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, 2021, vol. 2, no. 14, pp. 361–368. <https://doi.org/10.2147/IDR.S292612>
11. Tapal'skii D. V., Petrenev D. R., Khranchenkova O. M., Doroshkevich A. S. Antimicrobial and antifungal activity of lichen extracts common in Belarus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology], 2017, no. 2, pp. 60–65 (in Russian).
12. Kononova L. I., P'yankov I. A., Smolyak A. A., Shklyayev Yu. V., Korobov V. P. Synergistic effect of the cationic peptide hominin and a new disinfectant based on isoquinoline on formation of biofilms in multidrug-resistant *Staphylococci*. *Antibiotiki i khimioterapiya* [Antibiotics and chemotherapy], 2020, vol. 65, no. 6, pp. 11–18 (in Russian).
13. Odds F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, vol. 52, no. 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
14. Tapal'skii D. V., Lagun L. V. *Methods for determining sensitivity to a combination of antibiotics, gram-negative bacteria with hypersensitivity and complete antibiotic resistance: indications for use*. Gomel, Gomel State Medical University, 2017. 27 p. (in Russian).
15. Aaron S., Ferris W., Henry D., Speert D., Macdonald N. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, vol. 161, no. 4, pp. 1206–1212. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.9907147>
16. Lang B., Aaron S., Ferris W., Hebert P., MacDonald N. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, vol. 162, no. 6, pp. 2241–2245. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.2005018>
17. Okoliegebe I. N., Hijazi K., Cooper K., Ironside C., Gould I. M. Antimicrobial synergy testing: comparing the tobramycin and ceftazidime gradient diffusion methodology used in assessing synergy in cystic fibrosis-derived multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 8, art. 967. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080967>
18. Fatsis-Kavalopoulos N., Roemhild R., Tang P.-C., Kreuger J., Andersson D. I. CombiANT: Antibiotic interaction testing made easy. *PLoS Biology*, 2020, vol. 18, no. 9, p. e3000856. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000856>
19. Kloezen W., Melchers R. J., Georgiou P.-C., Mouton J. W., Meletiadis J. Activity of cefepime in combination with the novel  $\beta$ -lactamase inhibitor taniborbactam (VNRX-5133) against extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates in *in vitro* checkerboard assays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, vol. 65, no. 4, p. e02338-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.02338-20>
20. Tapal'skii D. V. Susceptibility to combinations of antibiotics of carbapenemase-producing nosocomial strains of gram-negative bacteria isolated in Belarus. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy], 2018, vol. 20, no. 3, pp. 182–191 (in Russian).
21. Artyukh T. V., Sokolova T. N., Ostrovskaya O. B. Features of the resistance of clinical isolates of *E. coli* and *C. albicans* forming a biofilm. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of Vitebsk State Medical University], 2021, vol. 20, no. 1, pp. 46–54 (in Russian).
22. Adamovich T. G., Gavrilova I. A., Kiril'chik E. Yu. Methods for studying the antimicrobial activity of antibiotics and antiseptics *in vitro*. *Sovremennye tekhnologii v meditsinskom obrazovanii: materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 100-letiyu Belorusskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta (Minsk, 01–05 noyabrya 2021 goda)* [Modern technologies in medical education: materials of the international scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the Belarusian State Medical University (Minsk, November 01–05, 2021)]. Minsk, 2021, pp. 1540–1543 (in Russian).
23. Foerster S., Unemo M., Hathaway L. J., Low N., Althaus C. L. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for *in vitro* evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiology*, 2016, vol. 16, art. 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0838-9>
24. Filimonova A. V., Golikova M. V., Strukova E. N., Portnoy Y. A., Kuznetsova A. A., Zinner S. H. Predicting the effects of carbapenem/carbapenemase inhibitor combinations against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in time-kill experiments: alternative versus traditional approaches to MIC determination. *Antibiotics (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 12, art. 1520. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121520>
25. Chan E. L., Zabransky R. J. Determination of synergy by two methods with eight antimicrobial combinations against tobramycin-susceptible and tobramycin-resistant strains of *Pseudomonas*. *Microbial Drug Resistance*, 1987, vol. 6, no. 2, pp. 157–164. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(87\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(87)90101-5)

26. Antimicrobial resistance surveillance in Central Asia and Europe, Annual report of the WHO Regional Office for Europe (2019). Available at: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/473267/CAESAR-annual-report-2019-rus.pdf) (accessed 12.11.2021).

27. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W. S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 2020, vol. 81, no. 2, pp. 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05>

28. Sinopal'nikov A. I. COVID19 pandemic is a «pandemic» of antimicrobial therapy. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy], 2021, vol. 23, no. 1, pp. 5–15 (in Russian).

29. Tapal'skii D. V., Karpova E. V., Akulenok O. M., Okulich V. K., Generalov I. I., Leskova N. Yu. [et al.]. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* against the backdrop of the COVID-19 pandemic: experience of a multidisciplinary hospital. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious diseases: news, opinion, education], 2021, vol. 10, no. 3, pp. 15–22 (in Russian).

30. Effah C. Y., Drokow E. K., Agboyibor C., Liu S., Nuamah E., Sun T. [et al.]. Evaluation of the therapeutic outcomes of antibiotic regimen against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, vol. 12, art. 597907. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.597907>

### Информация об авторе

Артюх Татьяна Валерьевна – магистр мед. наук, ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: [taniaartsiukh@gmail.com](mailto:taniaartsiukh@gmail.com). <https://orcid.org/0000-0001-7368-0623>

### Information about the author

Tatiana V. Artyukh – Master of Medical Sciences, Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: [taniaartsiukh@gmail.com](mailto:taniaartsiukh@gmail.com). <https://orcid.org/0000-0001-7368-0623>

**ВУЧОНЫЯ БЕЛАРУСІ**  
**SCIENTISTS OF BELARUS**

**НИКОЛАЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ КАРТЕЛЬ**

**(К 85-летию со дня рождения)**



«...методология генетической инженерии таит в себе огромные возможности для целенаправленного преобразования живых существ, создания различных новых биотехнологий, которые позволяют выходить на совершенно новый уровень развития многих отраслей хозяйственной деятельности человека»

*академик Н. А. Картель*  
(1937–2013 гг.)

5 мая 2022 г. исполнилось 85 лет со дня рождения выдающегося деятеля белорусской науки академика Николая Александровича Картеля. Н. А. Картель – доктор биологических наук, профессор, академик Международной академии наук Евразии, заслуженный деятель науки Республики Беларусь. Он внес значительный вклад в развитие генетической инженерии и молекулярной генетики в стране, являлся основателем белорусской молекулярно-генетической школы.

Интерес к научной работе Николай Александрович проявлял уже в студенческие годы, посещал лекции ученых-генетиков Н. В. Турбина и А. В. Константинова. В 1960 г. он поступил в аспирантуру Белорусского лесотехнического института и в 1964 г. защитил кандидатскую диссертацию. После стажировки в Великобритании, Швеции и Дании Николай Александрович приступил к работе в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси. С 1974 г. руководил созданной им группой генетической трансформации, на базе которой в 1985 г. была образована лаборатория молекулярной генетики, которую он возглавлял до 2012 г.

В 1984 г. Н. А. Картелю была присуждена ученая степень доктора биологических наук по специальности генетика. В 1986 г. он был избран член-корреспондентом НАН Беларуси, в 1996 г. – академиком НАН Беларуси. С 1979 г. по 1994 г. занимал должность заместителя директора по научной работе Института генетики и цитологии НАН Беларуси, а с 1994 по 2004 г. являлся директором этого института.

Сфера научного интереса академика Н. А. Картеля была достаточно велика и включала генетику, молекулярную генетику, генетическую трансформацию растений и животных. Первые опубликованные им научные работы касались древесных пород. Затем совместно с В. Г. Володиным Николай Александрович начал изучать процессы мутагенеза у растений. Исследования, выполненные совместно с академиком Н. В. Турбиным, В. Ф. Сойфером и др., легли в основу развития направления генетической трансформации растений в Беларуси. Под его руководством были разработаны методические подходы для создания модельных и сельскохозяйственных генетически модифицированных растений, сконструированы эффективные векторные конструкции для трансформации. Были получены генетически модифицированные растения, несущие целевые гены, выполняющие различные функции. Среди них: растения табака и арабидопсиса, несущие гены биосинтеза рамнолипидов (*rhlA* и *rhlB*), толерантные к некоторым тяжелым металлам и способные к деградации нефтепродуктов; трансгенные растения картофеля, проявляющие устойчивость к личинкам колорадского жука; растения табака, наперстянки и рапса, несущие гетерологичный ген, кодирующий полноразмерную последовательность кДНК *sup11a1* цитохрома

p450scc животного происхождения, экспрессия которого приводит к образованию функционально активного белкового продукта и к изменению фенотипических свойств растений; растения табака и картофеля, несущие ген глюкозооксидазы, присутствие которого приводит к устойчивости трансгенных растений к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды, и др. Работы по созданию трансгенных растений велись как самостоятельно, так и в тесном сотрудничестве с учеными других институтов и стран, среди которых С. Г. Спивак, Я. Б. Блюм, Б. В. Моргунов, Н. В. Кучук, Г. В. Шпаковский и др.

Большой вклад академик Н. А. Картель внес в развитие молекулярной генетики в стране. Он инициировал работы по изучению структуры и функции генома растений. Так, в частности, он уделял большое внимание повторяющимся последовательностям, выяснению их роли, возможности использования в качестве молекулярных маркеров для решения теоретических и практических задач. С помощью молекулярных маркеров к простым повторам на генетической карте ржи были картированы хозяйственно-ценные гены. Исследования проводились совместно с В. Н. Корзуном, А. В. Войлоковым, С. П. Соснихиной, А. Бернером и др. Под руководством Н. А. Картеля в стране были начаты работы по привлечению технологии молекулярных маркеров для решения практических селекционных задач, по внедрению методов маркер-сопутствующей селекции в селекционный процесс и ДНК-идентификации сортов сельскохозяйственных растений. Исследования Н. А. Картеля включали как теоретический, так и прикладной аспект, соответствовали мировым тенденциям развития генетической науки и биотехнологии. В настоящее время эти направления интенсивно развиваются и дают значительный практический эффект.

Высокий уровень проводимых Н. А. Картелем исследований отражают многочисленные публикации в республиканских и международных научных изданиях. В общей сложности им опубликовано 648 научных и научно-популярных работ, включая монографии, книги, учебники, энциклопедический словарь. Он является автором 10 патентов на изобретения, в том числе 2 патентов Российской Федерации, и 1 авторского свидетельства. Н. А. Картель выступал с докладами на международных конференциях в Германии, Англии, Франции, Польше, Израиле, Чехии, Японии, Испании, Словении и др. Большое внимание Николай Александрович уделял созданию научной школы и подготовке научных кадров. Под его руководством защищено 16 кандидатских диссертаций по специальностям генетика и молекулярная генетика.

Выдающийся вклад академика Н. А. Картеля в науку был высоко оценен государством и научным сообществом. Он был награжден медалями им. Н. И. Вавилова и Франциска Скорины, многочисленными грамотами министерств и ведомств, удостоен звания «Заслуженный деятель науки Республики Беларусь».

Николай Александрович обладал выдающимися качествами как ученого, так и личностными. Он пользовался большим уважением коллег, учеников, сотрудников Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Память о нем живет в их сердцах и находит отражение в развитии заданных им научных направлений.

*Академик А. В. Кильчевский, академик Л. В. Хотылева,  
член-корреспондент Р. И. Шейко, О. Ю. Урбанович*