

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**ПОЛЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**СБОРНИК**  
**материалов V международной**  
**научно–практической *online-offline***  
**конференции “Биотехнология:**  
**достижения и перспективы развития”**

**Полесский государственный университет,  
г. Пинск, Республика Беларусь,  
25–26 ноября 2021 г.**

**Пинск 2021**

УДК 60  
ББК 30.16  
Б 63

Редакционная коллегия:  
Дунай В.И. (гл. редактор),  
Волкова Е.М., Глинская Н.А., Кручинский Н.Г.,  
Никандров В.Н., Тыновец С.В., Чешевиц В.Т., Штепа В.Н.

**Биотехнология: достижения и перспективы развития:** сборник материалов V международной научно-практической конференции, УО “Полесский государственный университет”, г. Пинск, 25–26 ноября 2021 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2021. – 237 с.

ISBN 978–985–516–703–8

Приведены материалы участников V международной научно-практической конференции “Биотехнология: достижения и перспективы развития”.  
Материалы изложены в авторской редакции.

УДК 60  
ББК 30.16

ISBN 978–985–516–703–8

© УО “Полесский государственный университет”, 2021

*Благодарим  
за оказанную помощь в организации мероприятия  
участников Инновационно-промышленного кластера  
в области биотехнологий и зеленой экономики:  
**КФХ «Синяя Птица»** (профессиональное производство саженцев  
и ягод голубики высокорослой);  
**КФХ «ФруктГолден»** (производство ягод голубики и земляники садовой);  
**КФХ «МатерраАгро»** (производство ягод голубики);  
Общество с ограниченной ответственностью  
**«Профполив»** (реализация автоматических систем полива  
от проекта до сбора урожая);  
Брестское областное экологическое общественное объединение  
**«Зеленые инициативы Полесья»** (разработка путей улучшения  
экологических условий для жизни граждан и деятельности юридических лиц,  
во взаимодействии с государственными органами власти,  
организациями и гражданами).*

*Надеемся на наше дальнейшее сотрудничество и ваше активное участие!*

*Оргкомитет конференции*

# ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 577.21:631.52

## ДНК-ПАСПОРТИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ

М.М. Воробьёва, А.Д. Пошелюк

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, vorobjeva.m@polessu.by

ДНК-штрихкодирование (ДНК-паспортизация, ДНК-баркодинг) – метод корректной видовой идентификации живых организмов по коротким генетическим маркерам в ДНК. На сегодняшний день, молекулярно-генетические подходы нашли широкое применение в флористических и фаунистических исследованиях и являются эффективным дополнением классических подходов.

Разработчиком концепции и крупнейшим мировым лидером в области ДНК-штрихкодирования живых организмов выступает Институт биоразнообразия в Онтарио (Канада). На базе этого института создана и постоянно пополняется Глобальная база данных ДНК-штрихкодов живых организмов (BOLD). Американским национальным центром биотехнологической информации также разработана база данных нуклеотидных последовательностей – GenBank. Она является бесплатной, общедоступной и содержит последовательности ДНК, РНК и белков, снабженных литературными ссылками и различной биологической информацией.

К категории редкие виды принадлежат растения, имеющие низкую численность и ограниченный ареал, тем не менее они являются составной частью биоразнообразия нашей страны, в связи с чем возникает необходимость в сохранении ценного генофонда. В последние годы в Беларуси и сопредельных ей регионах для скрининга видового разнообразия растений используют метод ДНК-штрихкодирования, в частности корректную идентификацию видовой принадлежности производят по небольшому фрагменту ткани, на самой ранней стадии развития растения, по семенам или гербарному материалу. Применительно к растениям в настоящее время наиболее востребованы ядерные спейсеры — ITS1 и ITS2, пластидные гены – *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *psbK-psbI*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* [1].

Поскольку изучение редких видов растений и сохранение их биологического разнообразия является приоритетным направлением Республики Беларусь на 2021–2025 гг. (указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г.) в рамках нашего исследования было принято решение получить ДНК-паспорта для некоторых редких видов растений, занесенных в Красную книгу РБ. Сопровождение образцов редких видов растений ДНК-штрихкодом позволит исключить случаи неверного определения вида, обеспечит контроль чистоты образца и будет служить подтверждением качества биологического материала. Кроме того, определение маркерных ДНК последовательностей может быть полезным при уточнении таксономического статуса отдельных видов.

В качестве объектов исследования определены – зверобой горный (*Hypericum montanum*), дрок германский (*Genista germanica*), горичник олений (*Peucedanum cervaria*), берула прямая (*Berula erecta*), произрастающие на территории Беларуси и занесенные в Красную книгу, 2015 г. (таблица 1) [2].

Таблица 1. – Виды растений, произрастающие на территории Беларуси и занесенные в Красную книгу [2]

№	Вид		Категория охраны	
			РБ	МСОП
1	Зверобой горный	<i>Hypericum montanum</i>	III	VU
2	Дрок германский	<i>Genista germanica</i>	IV	VU
3	Горичник олений	<i>Peucedanum cervaria</i>	III	VU
4	Берула прямая	<i>Berula erecta</i>	III	LC

Образцы для исследования предоставил Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси.

Исследования проводились в лаборатории экологической генетики и биотехнологии, Государственного научного учреждения «Института генетики и цитологии Национальной Академии наук Беларуси». Для выделения использовали коммерческий набор Genomic DNA Purification Kit Thermo Fisher Scientific (USA) без внесения изменений. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически и по средствам электрофоретического разделения.

Для ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: буфер 10x, 25M MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 3% DMSO, 5U/μl Hi-Fi ДНК-полимераза; олигонуклеотиды (таблица 2). Продукты амплификации визуализировали в 1,5% агарозном геле. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе.

Таблица 2. – Праймеры для амплификации маркерных последовательностей, используемые в рамках настоящего исследования [3]

Название праймера	Последовательность праймеров	Размер ПЦР продукта, п.н.
rbcL	5'- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC -3' 5'- GTAAAATCAAGTCCACCGCG -3'	~654
ITS2	5'- ATGCGATACTTGGTGTGAAT -3' 5'- GACGCTTCTCCAGACTACAAT -3'	~494

В рамках настоящего исследования было принято решение оценить представленность ядерных спейсеров – ITS1 и ITS2, пластидных генов – rpoB, rpoC1, rbcL, matK, psbK-psbI, trnH-psbA, atpF-atpH в BOLD, для того чтобы выбрать маркеры, по которым будет осуществляться ДНК-штрихкодирование редких видов растений фауны Беларуси (таблица 3).

Таблица 3. – Оценка представленности последовательностей ядерных спейсеров и пластидных генов в BOLD растений фауны Беларуси, охваченных настоящим исследованием

Вид	Ядерные спейсеры		Пластидные гены							Страна-коллектор
	ITS1	ITS2	rpoB	rpoC1	rbcL	matK	psbK-psbI	trnH-psbA	atpF-atpH	
<i>Hypericum montanum</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	Великобритания, Италия и Дания
<i>Genistagermanica</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Германия, Италия, Россия, Франция, Польша, Швеция,
<i>Peucedanum cervaria</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Австрия
<i>Berula erecta</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	Узбекистан, Кыргызстан, Иран, Турция, Пакистан, Дания, Великобритания, США, Канада
Всего н.п.	4	24	0	0	14	7	0	1	0	

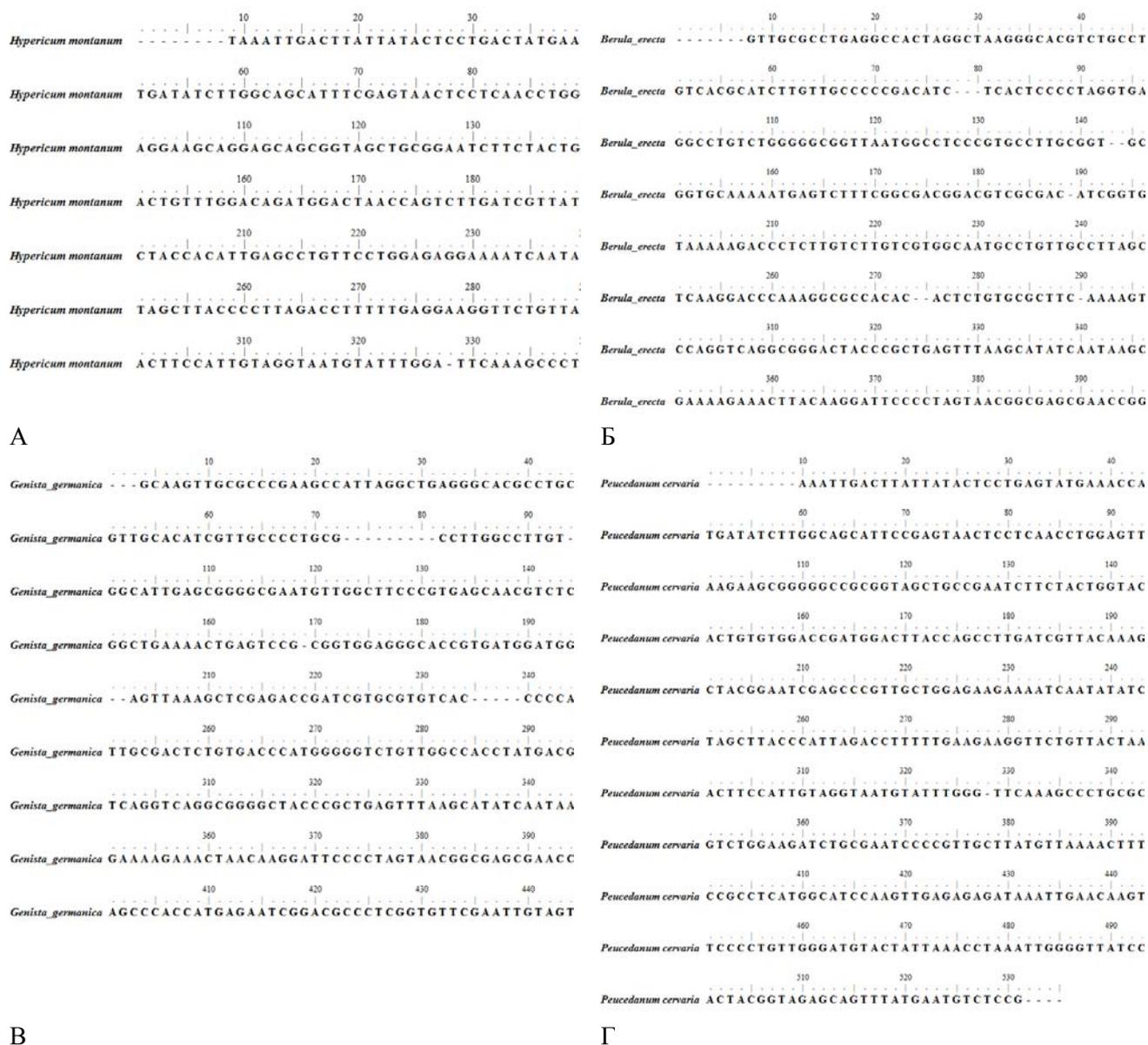
«+»– представлен в BOLD, «-»– отсутствует в BOLD

Среди анализируемых видов растений Беларуси наиболее хорошо представлен – *Berula erecta* (27 н.п.), недостаточно – *Peucedanum cervaria* (2 п.н.). Кроме того, необходимо отметить, что последовательности данных видов растений для Беларуси на сегодняшний день не депонированы в

BOLD [4] и GenBank [5]. Учитывая крайне недостаточную представленность в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей выше представленных растений, а также принадлежность этих растений к охраняемым видам на территории нашей страны, мы приняли решение получить ДНК-паспорта для *H. montanum*, *G. germanica*, *P. cervaria*, *B. erecta*, которые могут быть использованы для идентификации видов, каталогизирования таксонов, определения границ видов, а также изучения генетического полиморфизма.

ДНК-паспорта получены в результате расшифровки последовательностей ITS2 и *rbcl*, поскольку именно эти маркеры наиболее хорошо представлены в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей.

Результаты секвенирования последовательности *rbcl* для анализируемых видов растений представлены на рисунке 1.



А – зверобой горный (*Hypericum montanum*); Б – берула прямая (*Berula erecta*);  
 В – дрок германский (*Genista germanica*); Г – горичник олений (*Peucedanum cervaria*)

**Рисунок 1. – ДНК-паспорта получены в результате расшифровки последовательностей *rbcl***

Результаты секвенирования последовательности ITS2 для анализируемых видов растений представлены на рисунке 2.

```

10      20      30      40
Hypericum_montanum - ACGCAAGTTGGCCCGGAAGCCCTCTGGCCGAGGGCACGCCCT
60      70      80      90
Hypericum_montanum GTCACACATCGTCGCCCCCAAATTCGATATCTCGCCAGA
110     120     130     140
Hypericum_montanum GGAAGAGGATGGGCGGAAAATGGTCTCCCGTGGCTCCCGTT
160     170     180     190
Hypericum_montanum GCCCAAAATGAGTTCTGGCAAAGCAAAGCCACGACCAGCG
210     220     230     240
Hypericum_montanum AAGACCCTCGGTACAAGTCGTGAGCCTTGCATTGCTCGTAGG
260     270     280     290
Hypericum_montanum GACCCCTGAACGTGATCGAGTAACATCGAACACTCACAAGTG
310     320     330     340
Hypericum_montanum TCAGCGGGACTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCG
360     370     380     390
Hypericum_montanum GAAACTAACAAAGGATTCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGG
410     420     430     440
Hypericum_montanum AGCTTGAAAATCGGATGCCCCAGGCGTTCGAATTGTAGTCTG
Hypericum_montanum TCAA

```

А

```

10      20      30      40
Peucedanum_cervaria GACGCAAGTTGGCCCGGAAGCCACTAGGCCGAGGGCACGCTCT
60      70      80      90
Peucedanum_cervaria GTCACGCATCGTCTTGCCCAAAACCACTCACACCTGAGAAAG
110     120     130     140
Peucedanum_cervaria GTTGGGGCGGAAACTGGCCCTCCCGTACCTTGTCTGTGGTTT
160     170     180     190
Peucedanum_cervaria AACGAGTCTCCGGCGACGGACGTCGCGACATCGGTGGTTGTA
210     220     230     240
Peucedanum_cervaria TCTTGTCTTGTGGGGCAAACCTCGTCATCTTAGCGAGCTCC
260     270     280     290
Peucedanum_cervaria TATGAGCACACACTCTGTGCGCTTCGACTGTGACCCAGGT
310     320     330     340
Peucedanum_cervaria ACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
360     370     380     390
Peucedanum_cervaria AAGGATCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAACAGCCAC
410     420     430     440
Peucedanum_cervaria ATTGGTCGGCTCTGCCGTCGGAATTGTAGTCTGGAGAAGCGT

```

В

```

10      20      30      40
Genista_germanica - -GCAAGTTGGCCCGAAGCCATTAGGCTGAGGGCACGCCCTGG
60      70      80      90
Genista_germanica GTTGCACATCGTTGCCCTGGCCCTTGGCTTAGGCATT
110     120     130     140
Genista_germanica GGCGAATGTTGGCTTCCCGTGGAGCAACGCTCTCAGGGTTGGCTGA
160     170     180     190
Genista_germanica AGTCCGCGGTGGAGGGCACCGTGATGGATGGTGGATGAGTTAAA
210     220     230     240
Genista_germanica GACCGATCGTGCCTGTACCCCACTAGCTTTGGGACTCTGTGA
260     270     280     290
Genista_germanica GGGGTCTGTTGGCCACCTATGACGGGAACCTCAGGTGACGGCGGG
310     320     330     340
Genista_germanica CGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAAC
360     370     380     390
Genista_germanica TCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAGAGCCACCATGAGA
410     420     430     440
Genista_germanica CGCCCTCGGTGTTTGAATTGTAGTCTGGAGA

```

Б

```

10      20      30      40
Berula_erecta - - - -GTTGCGCCTGAGGCCACTAGGCTAAGGGCACGCTGTCCT
60      70      80      90
Berula_erecta GTCACGCATCTTGTGGCCCGACATCTCACTCCCTAGGTGAGCT
110     120     130     140
Berula_erecta CTGTCTGGGGCGGTTAATGGCCTCCCGTGCCTTGGGTGCGGTTG
160     170     180     190
Berula_erecta AAAAAAGAGTCTTTCGGCGACGGACGTCGCGACATCGGTGGTTGTA
210     220     230     240
Berula_erecta GACCCCTTGTCTTGTGCTGGCAATGCCTGTTGCCTTAGCGAGCTC
260     270     280     290
Berula_erecta ACCCAAAGGCGCCACACACTCTGTGCGTTCAAAAGTGACCCAGG
310     320     330     340
Berula_erecta GCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAA
360     370     380     390
Berula_erecta CTTACAAGGATTCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAATTGGCC

```

Г

А – звербой горный (*Hypericum montanum*); Б – дрок германский (*Genista germanica*); В – горичник олений (*Peucedanum cervaria*); Г – берула прямая (*Berula erecta*)

**Рисунок 2. – ДНК-паспорта получены в результате расшифровки последовательностей ITS2**

Мы решили проверить достоверность полученных нами результатов секвенирования, путем сравнительного анализа расшифрованных нами нуклеотидных последовательностей *rbcL* и *ITS2* с нуклеотидными последовательностями из NCBI. Эффективность определения составила 100% и 99,19% соответственно.

Таким образом, в результате исследования, получены ДНК-штрихкоды для 4 видов растений, занесенных в Красную книгу РБ, что сделано впервые. Эффективность определения последовательностей *rbcL* составила 100%, а *ITS2* – 99,19%. В дальнейшем планируется депонировать последовательности *rbcL* и *ITS2* в GenBank.

#### Список использованных источников

1. Barcoding of life: Беларусь – участник глобальной инициативы по ДНК-штрих-кодированию жизни / Н. В. Воронова [и др.] // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 167–171.
2. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / гл. редкол.: И. М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. Энцыкл. ім.П. Броўкі, 2015. – 448 с.

3. Подбор маркеров для ДНК-баркодинга диких видов семейства *Orchidaceae* на примере *Anacamptis morio* L. / Н. В. Савина [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – 2018. – Т. 24. – С 5–11.

4. NCBI BLAST [Electronic resource] / National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 15.10.2021.

5. BOLD Systems [Electronic resource]: The Barcode of Life Data Systems / CCDB (The Canadian Centre for DNA Barcoding). – Mode of access: [http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public\\_Primer\\_PrimerSearch](http://ccdb.ca/http://boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch). – Date of access: 15.10.2021.

УДК 579.841: 577.114

## ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА МИКРОБНОГО ПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА СМЕСИ ЭТАНОЛА И ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА

А.А. Вороненко, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, [voronenkoandr@gmail.com](mailto:voronenkoandr@gmail.com)

Ежегодно наращиваются объёмы производства микробных экзополисахаридов (ЭПС), которые благодаря своим уникальным физико-химическим (изменение реологических характеристик водных систем, гелеобразование, эмульгирование и т.д.) и биологическим (иммуномодулирующая, противовоспалительная, бактерицидная активность и т.д.) свойствам широко используются в различных отраслях, от пищевой до нефтеперерабатывающей [0-0, 0].

Одним из эффективных подходов к интенсификации синтеза данных практически ценных метаболитов является использование смеси ростовых субстратов [0, 0]. Применение такого подхода позволяет избежать непродуктивных потерь углерода и энергии, имеющих место при использовании моносубстратов, а также повысить эффективность трансформации обоих субстратов в биомассу и вторичные метаболиты.

Отметим, что согласно классической концепции вспомогательного субстрата использование микроорганизмами смеси двух энергетически избыточных субстратов не предполагается [0]. В то же время имеется информация о вовлечении обоих таких субстратов как в энергетический, так и конструктивный метаболизм.

Исходя из этого, мы предположили возможность интенсификации синтеза экзополисахарида этаполана (продуцент *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005) на смеси этанола и подсолнечного масла – двух энергетически избыточных субстратов, при культивировании на которых наблюдали высокие показатели синтеза этого ЭПС [0, 0].

Таким образом, цель данной работы – установить условия культивирования штамма ИМВ В-7005, обеспечивающие максимальные показатели синтеза микробного полисахарида этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла.

Бактерии культивировали в минеральной среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8;  $\text{KOH}$  – 0,9;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,4;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат (0,5 % по объёму) и мультивитаминный комплекс «Комплевит» (0,00085 % в пересчете на пантотенат).

В качестве источника углерода и энергии использовали: *моносубстраты* – этанол (1,66 %, по объёму), рафинированное подсолнечное масло (1,0 %, по объёму); *смешанный субстрат* – смесь этанола (1,0 %, по объёму) и рафинированного подсолнечного масла (0,2-0,6 %, по объёму).

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную в среде с этанолом (0,5 %), маслом (0,5 %) или смесью этанола (0,25 %) и масла (0,25 %).

Культивирование осуществляли в колбах объёмом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 120 ч.

Концентрацию биомассы определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую биомассу по калибровочному графику. Концентрацию ЭПС определяли весовым методом после осаждения изопропиловым спиртом. ЭПС-синтезирующую способность определяли как отношение концентрации ЭПС к концентрации биомассы и выражали в г ЭПС / г биомассы.

Определение оптимального молярного соотношения концентраций субстратов (этанол и рафинированное подсолнечное масло) в смеси базировалось на соответствующих теоретических расчётах. Поскольку при метаболизме каждого энергетически избыточного субстрата в смеси до фосфоглицерата (ФГК, центральный углеродный предшественник) образуется достаточное для синтеза клеточных компонентов количество АТФ и восстановительных эквивалентов необходимо: 1) рассчитать уровень генерации энергии при синтезе ЭПС с этанола и подсолнечного масла; 2) определить «энергетический вклад» каждого субстрата на синтез ЭПС.

Энергетические расходы на синтез этаполана с этанола определяли на основе данных об активности ферментов цикла Кребса, глиоксилатного цикла, глюконеогенеза у штамма *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 и расчётов, приведенных в работе [0]. Генерацию энергии при катаболизме линолевой и олеиновой жирных кислот рассчитывали как описано в работе [0].

Комплексный полисахаридный препарат этаполан состоит из нейтрального и двух кислых ЭПС, один из которых является ацилированным (АП). Ацилированный и неацилированный (НАП) полисахариды имеют идентичное молярное соотношение *D*-глюкозы, *D*-манозы, *D*-галактозы, *L*-рамнозы, *D*-глюкуроновой и пировиноградной кислоты (3:2:1:1:1:1). АП дополнительно содержит в своем составе жирные кислоты (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>) [0].

При проведении расчётов предполагали, что часть жирных кислот масла может быть без значительных превращений использоваться для этерификации углеводной цепи ЭПС. Таким образом, предполагаемый «энергетический вклад» подсолнечного масла в биосинтез ЭПС составляет 25 %, а этанола – 75 % от общего количества энергии. Остальные предположения для теоретических расчетов аналогичны описанным в работе [0].

Статистическую обработку данных проводили, как описано ранее [0, 0]. Отличия средних показателей считали достоверными при 5 %-ном уровне значимости.

На первом этапе работы осуществляли теоретический расчёт оптимального молярного соотношения концентраций этанола и подсолнечного масла в смеси.

В результате анализа метаболических путей штамма ИМВ В-7005 установлено, что энергия генерируется при синтезе повторяющейся цепи ЭПС моносахаридов, жирных кислот и пирувата, входящих в состав повторяющейся цепи ЭПС. При этом генерируемое количество энергии составляет:

$$3,04 + 19,02 = 22,06 \text{ моль АТФ/ моль использованного субстрата (Табл. 1).}$$

Таблица 1. – Генерация энергии при синтезе повторяемого цепи АП и НАП полисахарида

Субстрат для синтеза ЭПС	ЭПС	Расход субстрата на синтез цепи ЭПС, моль	Генерация энергии, моль АТФ	
			На синтез цепи ЭПС	На моль использованного субстрата
Этанол	АП	32	91	2,84
	НАП	18	62	3,40
	АП+НАП	50	152	3,04
Подсолнечное масло	АП	4	63,06	15,77
	НАП	2	51,06	25,53
	АП+НАП	6	114,12	19,02

Согласно расчетам, изложенным в работах [0, 0], генерация энергии при превращении этанола и масла в ФГК составляет 5,0 и 39,5 моль АТФ/ моль использованного субстрата, соответственно.

Учитывая, что для синтеза одного моля биомассы необходимо 4 моля ФГК и 40 моль АТФ, можно рассчитать, что при культивировании штамма ИМВ В-7005 на смеси этанола и масла для образования ЭПС (в пересчёте на моль субстрата) остается 3,04 и 13,52 моль АТФ, соответственно, или 16,56 моль АТФ суммарно.

Принимая во внимание предположение, что при трансформации этанола и масла в ЭПС генерируется 75 и 25 % избыточной энергии соответственно, для генерации 16,56 моль АТФ необходимо 4,09 моль этанола и 0,31 моль масла, что соответствует молярному соотношению 1:0,076. Так, например, при концентрации этанола 1 % (по объему, 10 мл/л или 8 г/л, 0,174 моль) концентрация масла должно составлять 0,013 моль, или 3,66 г, или 3,98 мл, или 0,4 %.

На следующем этапе исследовали принципиальную возможность использования смеси этанола и масла для получения полисахарида этаполана при теоретически рассчитанном молярном соотношении их концентраций.

Установлено, что независимо от способа подготовки посевного материала показатели синтеза ЭПС были у 1,3-2,1 раза выше по сравнению с таковыми на соответствующих моносубстратах (Табл. 2). В последующих экспериментах инокулят выращивали на этаноле, поскольку при использовании такого посевного материала концентрация целевого продукта была максимальной (3,18 г/л).

Таблица 2. – Синтез этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла в зависимости от способа подготовки инокулята

Концентрация субстратов в среде для		ЭПС, г/л	ЭПС-синтезирующая способность, г ЭПС/г биомассы
биосинтеза ЭПС, %	получения инокулята, %		
Этанол, 1,0 та масло, 0,4*	Этанол, 0,5	3,18±0,16	1,85±0,09
	Масло, 0,5	2,14±0,11	1,39±0,07
	Этанол, 0,25 та масло, 0,25	2,00±0,10	0,84±0,04
Этанол, 1,66	Этанол, 0,5	1,49±0,07	0,93±0,05
Масло, 1,00	Масло, 0,5	1,63±0,08	1,10±0,06

Примечание – \*молярное соотношение этанола и масла составляло 1:0,076.

Поскольку теоретические расчёты базируются на ряде предположений и позволяют лишь ориентировочно определить молярное соотношение концентраций субстратов в смеси, на следующем этапе исследовали синтез полисахарида при различных молярных соотношениях концентраций этанола и масла в смеси.

Эксперименты показали, что наиболее высокие показатели синтеза этаполана (концентрация ЭПС – 4,2 г/л, ЭПС-синтезирующая способность – 2,0 г ЭПС/ г биомассы) наблюдались при молярном соотношении концентраций моносубстратов в смеси 1:0,056, максимально приближенном к рассчитанному теоретически (1:0,076) (Табл. 3). Мы предполагаем, что данное отклонение может быть обусловлено неравномерным использованием каждого субстрата в энергетическом и конструктивном метаболизме.

Таблица 3. – Влияние молярного соотношение этанола и рафинированного масла в смеси на показатели синтеза этаполана

Концентрация субстратов в среде для биосинтеза, %		Молярное соотношение этанола и масла	ЭПС, г/л	ЭПС-синтезирующая способность, г ЭПС/г биомассы
этанол	масло			
1,0	0,2	1:0,036	2,10±0,11	0,49±0,02
1,0	0,3	1:0,056	4,23±0,21	2,00±0,10
1,0	0,4	1:0,076	3,18±0,16	1,85±0,09
1,0	0,5	1:0,096	2,94±0,15	1,20±0,06
1,0	0,6	1:0,116	2,67±0,13	0,79±0,04

Примечание – Инокулят выращивали на этаноле.

На сегодняшний день использование смешанных субстратов в основном связано с получением различных микробных метаболитов (ферменты, этанол, метанол, липиды и т.д.) на основе лигноцеллюлозной биомассы (древесина, солома, жом и т.д.) [0]. В то же время информация об использовании лигноцеллюлозы для получения микробных ЭПС очень ограничена [0, 0].

Так, исследования способности *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 синтезировать микробный ЭПС санксан на смеси глюкозы и ксилозы показали, что независимо от соотношения концентрации субстратов в смеси (7:3, 5:5, 3:7) скорость их потребления, концентрация ЭПС и уровень биомассы в первые 24 ч культивирования были в 1,1-2,3 раза выше, чем показатели, полученные на соответствующих моносубстратах [0]. Однако к концу культивирования показатели синтеза были одинаковыми как на моно-, так и смешанном субстратах. Замена углеводов на 4 % (масс. % по углеводам) гидролизата кукурузной соломы (соотношение глюкозы и ксилозы 3,48:1) сопровождалась повышением концентрации синтезированного санксана до 13,4 г/кг.

Другие авторы [0] сообщают о способности *Aureobasidium melanogenum* TN2-1-2 при выращивании на среде, содержащей 11 % (масс. % по углеводам) гидролизата пшеничной соломы (соотношение глюкозы и ксилозы 78 %:22 %), синтезировать 55,1 г/л пуллулана. При росте на моносахаридах глюкозе и ксилозе концентрация ЭПС составляла 58,3 и 50,2 г/л соответственно.

Таким образом, в ходе проведенных теоретических расчётов и экспериментальных исследований установлено, что максимальные показатели синтеза этаполана достигаются при молярном соотношении концентраций этанола и рафинированного подсолнечного масла в смеси, равном 1:0,056.

#### Список использованных источников

1. Babel W., Müller R.H. (1985), Mixed substrates utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics, *Journal of General Microbiology*, 131(1), pp. 39-45.
2. Barcelos M.C.S., Vespermann K.A.C., Pelissari F.M., Molina G. (2020), Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), pp. 1475-1495.
3. Chukwuma O.B., Rafatullah M., Tajarudin H.A., Ismail N. (2021), A review on bacterial contribution to lignocellulose breakdown into useful bio-products, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6001), pp. 1-27.
4. Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. (2012), Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction, *Carbohydrate Polymers*, 87(2), pp. 951-962.
5. Fukuda K., Kono H. (2021), Cost-benefit analysis and industrial potential of exopolysaccharides. In: Nadda A.K., K.V.S., Sharma S. Eds., *Microbial exopolysaccharides as novel and significant biomaterials*, Springer, Cham, pp. 303-339.
6. Liu G., Zhao X., Chen C., Chi Z., Zhang Y., Cui Q., Chi Z., Liu Y.J. (2020), Robust production of pigment-free pullulan from lignocellulosic hydrolysate by a new fungus co-utilizing glucose and xylose, *Carbohydrate Polymers*, 241(116400), pp. 1-10.
7. Pidhorskyi V., Iutinska G., Pirog T. (2010), *Intensification of microbial synthesis technologies*, Naukova Dumka, Kyiv (in Ukrainian).
8. Pirog T., Yarosh M., Voronenko A. (2021), Synthesis of microbial exopolysaccharides on non-traditional substrates, *Scientific Works of NUFT*, 27(1), pp. 42-52 (in Ukrainian).
9. Pirog T.P., Ivakhniuk M.O., Voronenko A.A. (2016), Exopolysaccharides synthesis on industrial waste, *Biotechnologia Acta*, 9(2), pp. 7-18.
10. Pirog T.P., Voronenko A.A., Yarosh M.B. (2020), Production of exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil, *Biotechnologia Acta*, 13(4), pp. 71-80.
11. Rana S., Upadhyay L.S.B. (2020), Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, pp. 577-583.
12. Wu M., Zhao X., Shen Y., Shi Z., Li G., Ma T. (2021), Efficient simultaneous utilization of glucose and xylose from corn straw by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 to produce microbial exopolysaccharide, *Bioresource Technology*, 319, pp. 1-9.

УДК 577.19 + 547.96

#### ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МЕТАЛЛА (МЕДИ) С ГЕСПЕРЕТИНОМ НА АКТИВНОСТЬ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ В КЛЕТКАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В.М. Гречко<sup>1</sup>, В.Т. Чещевик<sup>1</sup>, А. Sykula<sup>2</sup>, А. Dzeikala<sup>2</sup>, Е. Lodyga-Chruscinska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

<sup>2</sup>Лодзинский технический университет, Лодзь, Республика Польша

**Актуальность.** АВС транспортеры – это группа белков, которая осуществляет как импорт, так и экспорт широкого ряда компонентов в эукариотических клетках [1]. С одной стороны, АВС-транспортеры обеспечивают поддержание сбалансированного метаболизма клетки, с другой некоторые из них участвуют в реализации механизма множественной лекарственной устойчивости, что снижает эффективность лекарственной терапии [2].

В АВС белках дрожжей (*S. cerevisiae*) присутствуют трансмембранные домены (TMDs) и нуклеотидсвязывающие домены (NBDs), которые входят в структуру активного центра белка, в кото-

ром и происходит связывание молекулы АТФ и её гидролиз. Домены могут существовать в разных комбинациях, а именно, в «прямом» порядке TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, но также могут быть в «обратном порядке» NBD1-TMD1-NBD1-TMD2. При этом АВС белки могут быть представлены в виде полноразмерных (TMD6-NBD)<sub>2</sub> или (NBD-TMD6)<sub>2</sub>, или половинчатых транспортеров (TMD6-NBD), а также у них могут отсутствовать отдельные домены (TMD, NBD или NBD2) [3].

Согласно литературным данным *Saccharomyces cerevisiae* является идеальным модельным организмом для функционального анализа генов, связанных с болезнями, вследствие легкости и дешевизны их культивирования и полностью исследованного генома. Кроме того, дрожжевые клетки *S. cerevisiae* широко используются во многих процессах жизнедеятельности человека, начиная от пивоварения и виноделия, заканчивая производством биоэтанола. Эффективность работы промышленных штаммов зависит от их выживаемости в стрессовых факторах, а именно, при наличии этанольного стресса. Увеличение количества этанола, который накапливается до токсичных концентраций, приводит к отрицательному росту культуры, а также к застойным и вялым ферментациям. Повышенные концентрации этанола приводит к увеличению проницаемости мембраны и, как следствие, к диссипации трансмембранного электрохимического потенциала. [4]. Также было показано, что этанол ингибирует основные гликолитические ферменты и индуцирует образование активных форм кислорода. Одними из защитных механизмов клетки от пагубного влияния этанола являются АВС-транспортеры, которые напрямую могут участвовать в ремоделировании клеточной мембраны.

Одними из предполагаемых регуляторов АВС белков выступают флавоноиды, которые могут проявлять различные биологически-активные свойства (в том числе и выступать в качестве антиоксидантов). А добавление металлов (в данном случае меди (II)) может усиливать данные эффекты, в том числе и в отношении моделирования АВС-транспортеров [5].

**Цель работы:** исследование клеточных механизмов длительного действия комплекса металла (меди (II)) с гесперетином на активность АВС белков в клетках *S. cerevisiae*.

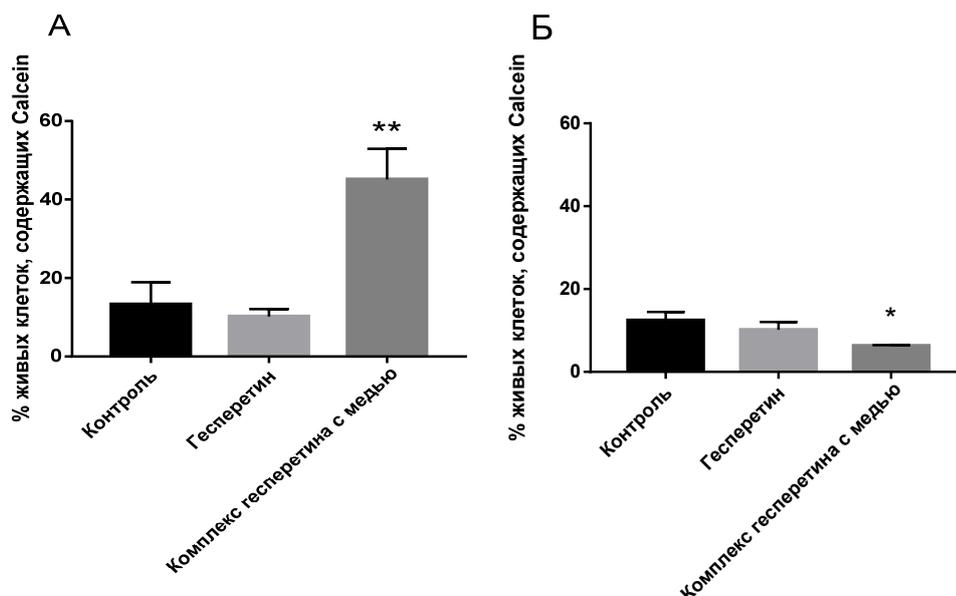
Клетки *S. cerevisiae* выращивали при 30 °С в питательной среде YNB (yeast nitrogen base), которая содержала 2% глюкозу и 50 мкМ каждого из исследуемых флавоноидов. Клетки дрожжей растили до логарифмической фазы роста в течении 18 часов (OD 600nm = 0.5±0.05) и стационарной фазы роста в течении 24 часов (OD 600nm = 1.5±0.05).

Клетки *S. cerevisiae* инкубировали с Calcein AM в течении 60 минут при 30 °С. Данный зонд был добавлен к суспензии клеток в концентрации 10 мкМ. Для определения жизнеспособности клеток, к суспензии был добавлен PI (propidium iodide) в концентрации 30 мкМ.

Исследование влияния комплекса металла с гесперетином на АВС белки в клетках дрожжей *S. cerevisiae* осуществляли при помощи проточной цитофлуориметрии.

В ходе проделанных экспериментов, было установлено, что как на логарифмической, так и на стационарной фазах роста, нативная молекула гесперетина никак не повлияла на активность АВС-транспортеров. Добавление металла меди (II) к молекуле гесперетина увеличило процент клеток *S. cerevisiae*, обладающих флуоресценцией на логарифмической фазе роста. При достижении клетками стационарной фазы роста, эффект вышеуказанного комплекса изменился. Добавление металла меди (II) привело к значительному снижению клеток, содержащих краситель кальцеин, в 3 раза по сравнению с контрольной группой нативного флавоноида гесперетина (Рисунок).

Кроме того, была проверена жизнеспособность клеток дрожжей в зависимости от добавленного флавоноида в суспензию клеток. Было установлено, что комплекс металла гесперетина как на стационарной, так и на логарифмической фазе отрицательно повлияли на рост культуры. Жизнеспособность клеток снизилась в 3 раза на логарифмической и в 4 раза на стационарной фазе по сравнению с контрольной группой нативной молекулы гесперетина.



**Рисунок – Процент живых клеток, содержащих краситель под действием гесперетина и его комплекса с металлом (А-логарифмическая фаза роста, Б-стационарная фаза роста)**

В результате проделанных экспериментов был сделан вывод о том, что комплекс металла с гесперетином обладает более сильным модулирующим эффектом по сравнению с нативной молекулой гесперетина. Более того, эффект на каждой фазе роста проявляется по-разному, что говорит о экспрессии разных видов белков под действием вышеуказанного комплекса. Данный эффект может позволить применять комплексы флавоноидов с металлом в низких концентрациях для моделирования активности разных АВС-транспортеров на разных фазах роста дрожжей *S. Cerevisiae*.

#### **Список использованных источников**

1. Balzi E. Yeast multidrug resistance: the PDR network/ E. Balzi, A. Goffeau//J. Bioenerg. Biomembr, 1995. – Vol. 27. – P. 71–76.
2. Kothandan, G. Docking and 3D-QSAR (quantitative structure activity relationship) studies of flavones, the potent inhibitors of P-glycoprotein targeting the nucleotide binding domain/ G. Kothandan, C. G. Gadhe, T. Madhavan, C. H. Choi, S. J. Cho//Eur. J. Med. Chem, 2011. – Vol. 46. – P. 4078–4087.
3. Davidson A.L. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems/ A.L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle// Mol. Biol. – Rev. 2008. – Vol. 72. – P. 317 – 364.
4. Sakowicz-Burkiewicz M. Suppression of TWIST1 enhances the sensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil/ M. Sakowicz-Burkiewicz, T. Przybyła, M. Wesserling, H. Bielarczyk, I. Maciejewska, T. Pawelczyk//J Biochem Cell Biol., 2016. – Vol. 78. – P. 268 – 278.
5. Lodyga-Chruscinska E. Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base/ E. Lodyga-Chruscinska [et al.]//J. of Inorganic Biochemistry, 2014. – Vol. 143. P. 387 – 398 p.

УДК 60.7:631/635

### **ОБЗОР ИЗМЕНЕНИЙ, ВНОСИМЫХ В ГАРМОНИЗИРОВАННУЮ СИСТЕМУ ОПИСАНИЯ И КОДИРОВАНИЯ ТОВАРОВ С 1 ЯНВАРЯ 2022 ГОДА**

**Д.С. Густова**

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Москва, Россия,  
d.gustova@fneps.ru

В статье приведен обзор поправок, внесенных в Гармонизированную систему описания и кодирования товаров Всемирной таможенной организации, вводимых в действие с 01 января 2022 года.

*Ключевые слова:* Всемирная таможенная организация; Гармонизированная система описания и кодирования товаров; классификация товаров; Товарная Номенклатура; международная торговля.

В настоящее время 179 стран мира, в том числе страны СНГ, являются членами Всемирной таможенной организации (ВТамО), на долю которых приходится 98% мировой торговли.

В качестве основополагающего механизма реализации миссии ВТамО в 1983 году был создан уникальный международный инструмент – Гармонизированная система описания и кодирования товаров (ГС). Цель ГС, отраженная в Международной Конвенции, – содействие международной торговле, упрощение сбора, сопоставления и анализа статистических данных, уменьшение расходов, вызываемых повторным описанием, классификацией и кодированием товаров, унификация коммерческих и таможенных документов, их обработка и т.д.

В современной торговле появляются новые товары, и их товароборот растет, они приобретают все большее значение на мировом рынке. Другие товары наоборот теряют свою актуальность и, соответственно, их товароборот уменьшается. Изменяется сама структура торговли. Все большее значение приобретает торговля промежуточными товарами, которые используются как полуфабрикаты во многих производствах. И для того, чтобы ГС оставалась все время актуальной и вносятся соответствующие изменения.

В 2022 году вступает в силу седьмое издание Гармонизированной системы описания и кодирования товаров - международной основы единой Товарной номенклатуры внешнеэкономической деятельности (ТН ВЭД ЕАЭС)

В преамбуле к Международной конвенции о Гармонизированной системе напрямую подчеркивается важность обеспечения обновления ГС в свете изменений технологий в структуре международной торговли. В статье 7 Конвенции говорится, что Комитет по ГС предлагает такие поправки Конвенции, которые могут быть желательными, в частности, для потребностей пользователей, то есть, для всех ее потребителей. На первой сессии Комитет по ГС принял решение создать Комитет по пересмотру ГС, основной задачей которого является рассмотрение вопросов от таможенных администраций стран-участников и международных торговых организаций, обсуждение предлагаемых изменений и выработываются необходимые поправки, которые потом рассматривает Комитет по ГС. Комитет также определил срок проведения таких изменений Номенклатуры. Установлено что соответствующие поправки должны быть внесены в диапазоне от 4 до 6 лет [1]. Фактически изменения в номенклатуру вносят каждые 5 лет.

Поправки к Номенклатуре, а их 351, можно ранжировать следующим образом:

- Сельское хозяйство, пищевая и табачная промышленности – 77;
- Химическая промышленность – 58;
- Лесная промышленность – 31;
- Текстильная промышленность – 21;
- Металлургия –27;
- Машиностроительная отрасль – 63;
- Транспорт – 22;
- Прочие отрасли –52.

Если сравнивать Номенклатуру 2022 года с первоначальной Номенклатурой, которая была принята и использовалась с 1988 года, можно сказать, что общее количество изменений, связанных с этими поправками, составило уже более 10%. То есть, если в Номенклатуре 1988 года использовалось 5019 кодов ГС, то в Номенклатуре 2022 года будет уже 5612 кодов. В таблице представлены структурно-статистические изменения в ГС 2022 года.

Таблица – Структурно-статистические изменения в ГС 2022 г.

№ п/п	Изменение товарных позиций и субпозиций	Статистика изменений		
		ГС 2017	Изменения в ГС 2022	ГС 2022
1.	Позиция (4 знака)	1,222	+6 (+8/-2)	5,387
2.	Субпозиция( 6 знаков)	1,228	+225 (+370/-145)	5,612

В среднем, каждые 5 лет рассматриваются и принимаются от 220 до 400 поправок. Сравнивая с номенклатурой 2017 года на сегодняшний день добавлено -8 новых товарных позиций (табл.1) [2].

Прежде всего, это товарные позиции:

- 03.09 – мука тонкого и грубого помола и гранулы из рыбы;
- 24.04 –новые табачные изделия, таких как вейперы и прочие средства доставки никотина в тело человека без сгорания;

- 38.27- многокомпонентные смеси ГФУ-хладагентов;
- 84.85 – 3D-принтеры;
- 85.24 – модули с плоской дисплейной панелью;
- 85.49 – отходы и лом электротехнических и электронных изделий,
- 88.06 –беспилотные летательные аппараты – квадрокоптеры, дроны,
- 88.07 –части летательных аппаратов.

В то же время были удалены две товарные позиции: товарная позиция **81.07** – кадмий. Общий объем торговли кадмием по данным Статистической организации Объединенных наций упал и стал значительно меньше уровня, необходимого для того, чтобы данный товар имел свою собственную товарную позицию. И удалена позиция – **88.03** –части летательных аппаратов.

К новой товарной позиции 03.09 «мука тонкого и грубого помола и гранулы из рыбы» изменен текст термина «мука из рыбы», к позиции 04.03 изменения коснулись текста термина «йогурт».

Комитет по Гармонизированной системе установил, чтобы товар мог иметь свою собственную товарную позицию, общегодовой оборот таких товаров должен превышать 100 миллионов долларов США в год. Для создания субпозиции пороговое значение определено в 50 миллионов долларов США.

В редакции ГС 2022 года установлено 370 новых субпозиций, при этом 145 субпозиций в действующей редакции удалены. Наглядно представлен ряд высокотехнологичных продуктов, отражающих общую изменяющуюся структуру торговли такими товарами.

Отходы и лом электротехнических и электронных изделий – это довольно широкий пласт товаров, которые в настоящей Номенклатуре классифицируются в разных товарных позициях и в то же время являются важным атрибутом для контроля за опасными товарами, и торговля такими товарами вызывает серьезные политические проблемы. Поэтому к ГС 2022 года было разработано Примечание 6 к Разделу 16 новая товарная позиция 85.49 для контроля за торговлю такими товарами.

Товарная позиция 24.04 «Новые табачные изделия» была создана, потому что появились новые товары, которые отличаются от традиционных сигарет, сигар, то есть товар, который обычно использует огонь для того, чтобы вдыхать дым, получившийся в результате сгорания табака. Нынешние технологии, такие как вайпер, ультразвуковые устройства доставки никотина, создали проблему с классификацией таких товаров и необходимость создания новой товарной позиции, чтобы сгруппировать все эти продукты в одном месте.

Для смартфонов создали новую субпозицию в товарной позиции 85.17. Были внесены изменения в субпозиции товарной позиции 70.19, где классифицируется стекловолокно и изделия из него, и товарной позиции 84.62 – где классифицируется оборудование для обработки металла давлением.

Эти изменения подтверждают тот факт, что в нынешней классификации и детализации позиций недостаточно точно отражены технические достижения в этих отраслях, что приводит к отсутствию важнейших статистических данных о торговле и потенциальным трудностям классификации.

Одной из приоритетных областей рассмотрения на будущее является развитие торговли и классификации многоцелевых промежуточных сборок. Например модули плоских панельных дисплеев, которые могут использоваться в различных товарах – мониторах, телефонах, компьютерах, игровых автоматах.

Для них была создана своя товарная позиция 85.24 и новое Примечание 7 к группе 85. В настоящее время данные товары классифицируются как части незавершенных изделий. Это создает проблемы, поскольку данный товар может использоваться для нескольких потенциальных законченных товаров в будущем, что приводит к неоднозначной классификации. С созданием самостоятельных товарных позиций таких проблем можно будет избежать.

Основными причинами седьмого цикла пересмотра ГС, были следующие вопросы:

- Общественное здоровье и безопасность;
- Защита общества и борьба с терроризмом;
- Товары контролируемые в соответствии с различными конвенциями;
- Продовольственная безопасность и защита окружающей среды;
- Технологический прогресс;
- Структура торговли;
- Разъяснение текстов ГС[3].

Вопросы *продовольственной безопасности и охраны окружающей среды* были подняты Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных наций (ФАО). В ГС 2012, 2017 годов уже был серьезный пересмотр относительно рыбы и рыбопродуктов, которые необходимо контролировать в целях продовольственной безопасности, для лучшего управления ресурсами. В ГС 2017 года была включена поправка, связанная с древесиной. С породами дерева, чтобы получить более полное представление о структуре такого или таких товаров.

В ГС 2022 года разработаны новые субпозиции в группах 2, 7, 8, 12 и 16 для конкретных продуктов, таких как – съедобные насекомые, различные виды грибов, кедровые орехи, кора африканской вишни.

В своем письме ФАО отметила, что большинство продуктов, предложенных ими для пересмотра в этих группах – орехи, грибы, травы, специи, дикие животные – используют в пищевых, медицинских и культурных целях на протяжении тысячелетий. Важная роль таких продуктов для получения финансовой прибыли, продовольственной безопасности, питания, удовлетворения основных потребностей человека и улучшения качества жизни – была отмечена ими в докладе о состоянии мировых лесов за 2014 год.

По оценкам доклада товарооборот таких продуктов в 2011 году составил 88 миллиардов долларов США. В среднем, 76 миллионов тонн таких продуктов использовалось в качестве продовольствия. Отмечено, что лекарственные растения, многие из которых произрастают в лесах, используются для оказания первичной медицинской помощи примерно для 80% населения развивающихся стран. Общемировая тенденция торговли лекарственными растениями достигает более двух с половиной миллиардов долларов США. При отсутствии необходимой детализации было очень трудно осуществить мониторинг этих товаров и понять – влечет ли сбор таких продуктов невосполнимые потери для природы, или нет, поскольку статистические данные на их торговлю были ограничены. Лекарственные растения не имели своих собственных позиций, субпозиций и классифицировались вместе с другими товарами.

Кроме того, в поправки ГС включается разработка дополнительных субпозиций в группе 44 – для древесных брикетов, опилок, для лесоматериалов породы тик, лесоматериалов многослойных клееных из шпона, изделий из тропической древесины, конструкционных изделий из лесоматериалов.

В связи с изменением в технологии получения различных видов масел была изменена товарная позиция 15.15, создана новая субпозиция 15.15.60 для жиров и масел микробиологического происхождения, их фракции. Это прежде всего касается масел, получаемых из плесени. Появилась новая технология получения таких масел, что соответственно, потребовало создания новой субпозиции.

Также были изменены текст и структура товарных позиций 85.39 для того, чтобы указать классификацию светодиодных источников света. Определение, которое дано в Примечании 11 к группе 85.

В товарных позициях 85.01, 85.41, 94.05 в соответствии с предложением Международного агентства по возобновляемым источникам IRENA для продуктов, которые используются в качестве источника солнечной энергии, были созданы отдельные субпозиции [4,5].

Резюмируя, можно сказать, поправки, внесенные в ГС 2022 года, не только отражают изменения в торговле, в технологиях, но и усиливают универсальный характер номенклатуры, учитывают потребность ее различных пользователей, изменения в технологии производства и структуре торговли.

#### **Список использованных источников**

1. Международная конвенция о гармонизированной системе описания и кодирования товаров от 14.06.1983. Брюссель.
2. Гармонизированная система описания и кодирования товаров. Онлайн база [Электронный ресурс]: <http://www.wcoomd.org/>
3. Региональный семинар ВТамО, связанный с внедрением поправок к ГС 2022. [Электронный ресурс]: <http://www.wcoomd.org/>
4. Бышовец В.А. Гармонизированная система описания и кодирования товаров ВТамО как основа товарных номенклатур СНГ и ЕАЭС// Материалы «Международного таможенного формула-2021» [Электронный ресурс]: <https://www.alt.ru/news/>
5. Андриянов Ю. Поправки к ГС 2022 Седьмое издание.// Материалы «Международного таможенного формула-2021» [Электронный ресурс]: <https://www.alt.ru/news/>

**ВЛИЯНИЕ ТИПА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ  
ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК,  
ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ *ECHINACEA PURPUREA* L. MOENCH****Т.И. Дитченко, В.А. Комарова, В.С. Гудель***Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, ditchenko@bsu.by*

Культивируемые *in vitro* клетки, ткани и органы растений широко используются в качестве модельных объектов в физиолого-биохимических, молекулярно-генетических исследованиях, а также являются важнейшим инструментом в биотехнологии растений [1]. С середины 80-х гг. прошлого века суспензионные культуры клеток лекарственных растений применяются для наработки вторичных метаболитов, используемых в фармацевтической, пищевой промышленности, а также при производстве косметических средств [2-3]. Однако применение культур клеток высших растений в биотехнологических производствах зачастую ограничено их недостаточной продуктивностью по целевым метаболитам и высокой стоимостью выращивания [4-5]. В связи с этим в 90-х гг. наряду с суспензионными культурами для производства биологически активных соединений растительного происхождения стали использоваться культуры генетически трансформированных корней (hairу roots), которые получают при помощи *Agrobacterium rhizogenes* [6]. В природе данные бактерии, попадая в поврежденные части растений, взаимодействуют с клетками и интегрируют в ядерный геном Т-ДНК своей мегаплазмиды, известной под названием Ri-плазида (goot-inducing). В отличие недифференцированных клеток суспензионных культур генетически трансформированные корни полностью сохраняют в условиях *in vitro* способность к синтезу корнеспецифичных для данного растения соединений, для них характерна высокая скорость и неограниченность роста на питательных средах без фитогормонов, активное формирование боковых корней из-за отсутствия апикального доминирования и потери геотропной ориентации [7]. В связи с этим hairу roots активно исследуются в качестве продуцентов ценных вторичных метаболитов, имеющих промышленное значение.

Перспективными объектами биотехнологии лекарственных растений являются культуры клеток и органов эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) [8-9]. Биомасса суспензионных культур и культур адвентивных корней эхинацеи выступает в качестве источника фенилпропаноидов (гидроксикоричные кислоты и их производные), полисахаридов. Экстрактивные вещества из недифференцированных клеток представителей рода *Echinacea* используются при производстве косметических средств либо в качестве биологически активных добавок (в частности, субстанции Echinan 4P, Echinaceae Stems GX и Echigena plus) [11]. Для культивирования клеточных суспензий и культур генетически трансформированных корней *Echinacea purpurea* в подавляющем большинстве работ используют питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС), которая является наиболее широко применяемой питательной средой для выращивания растительных объектов *in vitro*. Вместе с тем представляет интерес исследование возможности использования других питательных сред, в частности, среды Гамборга и Эвелега (В5) для культивирования клеток, тканей и органов данного лекарственного растения в качестве продуцентов вторичных метаболитов фенольной природы.

Целью настоящей работы явилось установление характера влияния типа питательной среды на содержание фенилпропаноидов и флавоноидов в культурах клеток, тканей и органов эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench).

Объектами исследования служили каллусная и суспензионная культуры корневого происхождения, каллусная и суспензионная культуры листового происхождения, культура генетически трансформированных корней. Исследуемые каллусные ткани представляли собой культуры рыхлого типа. Суспензионная культура корневого происхождения, в которой преобладали многоклеточные агрегаты, включающие десятки клеток, относилась к высокоагрегированному типу. Суспензионная культура листового происхождения, напротив, являлась слабоагрегированной. Культуру генетически трансформированных корней получали путем агробактериальной трансформации листовых эксплантов, изолированных из асептически выращенных проростков эхинацеи пурпурной, с помощью диких штаммов *Agrobacterium rhizogenes* 15834 и А4. Для культивирования растительных объектов в работе использовали питательные среды МС и В5 с добавлением 3% сахарозы в качестве ауксинов питательные среды содержали 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту в концентрации 0,2 мг/л и β-индолил-3-уксусную кислоту в концентрации 1 мг/л, в качестве цито-

кинина – кинетин в концентрации 0,5 мг/л. Культуры генетически трансформированных корней инкубировали на безгормональных средах МС и В5. Продолжительность ростового цикла суспензионных культур составляла 15 сут, каллусных культур и культуры генетически трансформированных корней – 30 суток. В конце ростового цикла производили отбор биомассы культивируемых *in vitro* клеток, тканей и органов *Echinacea purpurea*, для которой проводили определение активности ключевого фермента фенилпропаноидного метаболизма L-фенилаланинаммоний-лиазы. Остаток биомассы высушивали в сушильном шкафу при 60°C для последующего биохимического анализа. Содержание фенилпропаноидов в пересчете на цикориевую кислоту, флавоноидов в пересчете на кверцетин производили с помощью спектрофотометрического метода.

Установлено, что среди изученных объектов наиболее эффективными продуцентами фенилпропаноидов являются культуры генетически трансформированных корней. Использование питательной среды В5 для культивирования всех исследуемых объектов приводило к достоверному росту содержания фенилпропаноидов. Стимуляция продукции гидроксикоричных кислот и их производных в результате замены среды МС на среду В5 в наибольшей степени (в 1,5 раза) проявлялась для каллусной культуры корневого происхождения, которая имела самые низкие уровни их содержания при культивировании в стандартных условиях на среде МС. В случае культуры генетически трансформированных корней, которая изначально характеризовалась наиболее высоким биосинтетическим потенциалом, величина стимулирующего эффекта была минимальной (1,3 раза). Для суспензионной культуры корневого происхождения, каллусной и суспензионной культур листового происхождения прирост составлял в среднем 1,4 раза.

В отличие от фенилпропаноидов наиболее высокое содержание флавоноидов было характерно для суспензионной культуры листового происхождения, культивируемой на питательной среде В5. В каллусной культуре корневого происхождения уровни накопления данной группы вторичных метаболитов не зависели от типа питательной среды. В случае суспензионной культуры корневого и листового происхождения инкубация клеток на питательной среде В5 сопровождалась ростом их содержания в 1,5 и 1,6 раза, соответственно. Для культуры генетически трансформированных корней прирост составил 1,4 раза. В наибольшей степени (в 1,75 раза) стимулирующий эффект наблюдался для каллусной культуры листового происхождения.

Активность L-фенилаланинаммоний-лиазы в исследуемых объектах несущественно различалась при их культивировании на питательной среде МС. Использование среды В5 приводило к росту активности данного фермента в клетках каллусной и суспензионной культур корневого происхождения в среднем в 1,3-1,4 раза, а в клетках суспензионной культуры листового происхождения в 1,3 раза, тогда для культуры генетически трансформированных корней и каллусов листового происхождения достоверные отличия по сравнению со средой МС отсутствовали. На основании полученных данных не выявлена положительная корреляция между уровнями активности L-фенилаланинаммоний-лиазы и содержанием анализируемых вторичных метаболитов. Однако можно предположить, что для культур корневого происхождения, а также клеточной суспензии листового происхождения рост продукции фенилпропаноидов связан с повышением активности данного фермента.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что питательная среда В5 представляет собой хорошую альтернативу для культивирования *in vitro* культур клеток, тканей и генетически трансформированных корней *Echinacea purpurea* в качестве биотехнологических источников вторичных метаболитов фенольной природы. Стимулирующий эффект, вероятно, обусловлен гораздо более низким содержанием в ее составе аммонийного и нитратного азота, дефицит которых, как известно, приводит к усилению биосинтеза вторичных метаболитов разных классов в культурах клеток, тканей и органов лекарственных растений [11-12]. Установленные закономерности могут быть использованы при разработке продукционной питательной среды для культивирования клеток, тканей и органов *Echinacea purpurea* (L.) Moench в качестве продуцентов вторичных метаболитов фенольной природы.

#### Список использованных источников

1. Носов, А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент / А.М. Носов // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, №6. – С.837–844.
2. Yue W. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites / Yue W. [et al.]. // Critical Reviews in Biotechnology. – 2014. – Vol. 36, № 2. – P. 215–232.

3. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists / G. Guerriero [et al.] // *Genes*. – 2018. – Vol. 9, № 309. – P. 1–22.
4. Носов, А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения / А.М. Носов // *Биотехнология*. – 2010. – №5. – С. 8–28.
5. Karuppusamy, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures / S. Karuppusamy // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2009. – Vol. 3, № 13. – P. 1222–1239.
6. Srivastava S. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. / S. Srivastava, A.K. Srivastava // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 29-43.
7. «Косматые» корни растений – важный инструмент для исследований и мощная фитохим-биофабрика для производителей / Б.Р. Кулуев [и др.] // *Биомика*. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 70–120.
8. Echinacea biotechnology: challenges and opportunities. In *Vitro Cellular & Developmental Biology* / B. Abbasi [et al.] // *Plant*. – 2007 – Vol. 43, № 6. – P. 481–492.
9. Echinacea biotechnology: advances, commercialization and future considerations / J.L. Parsons [et al.] // *Pharm Biol*. – 2018. – Vol. 56, №1. – P. 485–494.
- Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102, № 20. – P. 8661–8675.
10. Isah T. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield / T. Isah [et al.]. // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2018. – Vol. 132. – P. 235–369.
11. Villarreal M.O. Plant cell culture strategies for the production of natural products / M.O. Villarreal [et al.] // *BMB Reports*. – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 149–158.

УДК 575.2:582.542.1

**СОЗДАНИЕ НОВОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ТОМАТА С ВЫСОКИМ НАКОПЛЕНИЕМ БЕТА-КАРОТИНА, КОМПЛЕКСНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БОЛЕЗНЯМ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТЬЮ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МАРКИРОВАНИЯ ПРИЗНАКОВ**

**Е.В. Дрозд, О.Г. Бабак, Н.А. Некрашевич, Н.В. Анисимова,  
К.К. Яцевич, А.В. Кильчевский**

*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь  
e.drozd@igc.by*

*Аннотация.* На основе разработанных молекулярных маркеров и адаптированных методик ДНК-типирования аллелей качества плодов *B*, *hp-2<sup>dg</sup>*, устойчивости к болезням *Ph-3*, *Cf-5*, типа роста главного побега *Sp*, функциональной мужской стерильности пыльников (ФМС) *ps-2* проведен скрининг популяции F<sub>2</sub> гибрида Песпех (С9464 × ЛВРН<sub>д</sub>), получен селекционный материал для создания новых материнских линий на основе ФМС с преимущественным накоплением β-каротина и устойчивостью к фитофторе, кладоспориозу. Из расщепляющейся популяции F<sub>2</sub> отобраны стерильные (с аллелем *ps -2*) и фертильные (с аллелем *Ps -2*) образцы с сочетанием аллелей *B/hp2<sup>dg</sup>/sp/Ph3/Cf5*, *b/hp2<sup>dg</sup>/Sp/Ph3/Cf5*. Данные формы будут использованы в дальнейшем селекционном процессе, направленном на создание новых форм с высоким качеством плодов и устойчивостью к патогенам.

*Ключевые слова:* *Solanum lycopersicum*, ДНК-маркеры

**Введение.** Современный рынок овощной продукции требует от производителя создания форм с высоким разнообразием по биохимическому составу, форме плодов, их окраске, вкусовым качествам. Вместе с тем для производителя крайне важно получать максимум продукции с минимальными денежными и трудовыми затратами. Выполнение данных задач является основополагающим для современных селекционных программ.

Решение проблемы повышения урожайности и улучшения качества плодов томата возможно лишь на основе создания гибридов F<sub>1</sub> с комплексом признаков качества плодов и устойчивости к патогенам, поскольку повышение устойчивости растения зачастую ведет к ухудшению вкусовых

качеств, а повышенный уровень содержания каротиноидов в плодах томата сопровождается увеличением восприимчивости растений к патогенам [1]. Селекционеры стремятся создать качественно новые сорта и гибриды, отвечающие современным требованиям. Учитывая, что получение гибридных семян томата достаточно трудоемкий процесс, при подборе родительских пар особое внимание следует уделять изучению их генетической составляющей.

Отбор с помощью молекулярных маркеров или маркер-сопутствующий отбор (MAS – Marker Assisted Selection) – сравнительно новый подход в селекции растений, основанный на прямой селекции растений по генам, определяющим хозяйственно-ценный признак. Использование MAS особенно актуально при контроле признаков, фенотипически проявляющихся на поздних стадиях развития растения (биохимический состав, период сохранности плодов) и др. Анализ с помощью ДНК-маркеров не зависит от изменений, связанных с факторами окружающей среды, что важно, например, при отборе устойчивых к патогенам генотипов при отсутствии возбудителя.

В Институте генетики и цитологии разработаны молекулярные маркеры к генам качества плодов, количества и состава каротиноидов (*B*, *hp-2<sup>dg</sup> t*, *Del*, *og*, *og<sup>c</sup>*, *gf*), устойчивости к болезням (*I-2*, *I-2C*, *Mi 1.2*, *Cf-4*, *Cf-4A*; *Cf-5 Cf-9*, *Tm2<sup>2</sup>*), а также к гену, контролирующему тип роста (*Sp/sp*). Совместно с Белорусской государственной сельскохозяйственной академией и Институтом овощеводства в результате циклической селекции созданы формы, сочетающие в своем генотипе 2-3 гена, определяющих химический состав плодов. Данные формы используются при создании гибридов F<sub>1</sub> как источник аллелей, детерминирующих определенный биохимический состав. Учитывая, что гибридизация является трудоемким процессом, важным способом упрощения и удешевления производства гибридных семян является использование материнских форм на основе функциональной мужской стерильности (ФМС). Ранее Институтом генетики и цитологии совместно с БГСХА создан ряд гибридов на основе ФМС с использованием стерильных форм, отобранных по фенотипу.

Gorguet В. с соавторами описали мутацию томата в гене *ORF4* полигалактуроназы, тесно связанную с фенотипом *positional sterility-2 (ps-2)* [2]. Разработка молекулярных маркеров к данному признаку позволила быстро и эффективно создавать новые стерильные формы томата. Так с использованием молекулярных маркеров создан ряд форм томата-черри на основе ФМС [1].

В связи с вышеизложенным, целью данных исследований было создание нового селекционного материала томата на основе ФМС с использованием молекулярных маркеров к аллелям, определяющим состав каротиноидов *B* и *hp-2<sup>dg</sup>*, а также генов устойчивости к фитофторе *Ph3* и кладоспориозу *Cf-5*. Аллель *Beta carotene (B)* детерминирует преимущественное накопление β-каротина. Аллель *high pigment 2 dark green (hp-2<sup>dg</sup>)* увеличивает количество накапливаемых в плодах пигментов. Кроме того, поскольку известно, что аллель *B* тесно сцеплен [3, 4, 5] с аллелем *sp (self pruning)*, определяющим детерминантный габитус растения, в задачу исследований входило изучение возможности создания индетерминантных форм с преимущественным накоплением β-каротина

**Материалы и методы исследования.** Для достижения поставленной цели выполнена гибридизация селекционных линий С9464 и ЛВРН<sub>д</sub> коллекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, БГСХА. Генотип Линии С9464 включает следующие аллели изучаемых хозяйственно-ценных признаков: индетерминантности (неограниченного роста главного побега) *Sp*, функциональной мужской стерильности *ps-2*, устойчивости к фитофторе *Ph-3*, устойчивости к кладоспориозу *Cf-5*. Генотип Линии ЛВРН<sub>д</sub> содержит аллели *B* и *hp-2<sup>dg</sup>*, обеспечивающие высокое накопление β-каротина в плодах, а также аллель детерминантности *sp*. Проведена оценка биометрических признаков гибрида F<sub>1</sub>, характеризующих габитус растения. Для отбора новых форм с желаемым комплексом аллелей получены семена гибридов F<sub>1</sub> и выполнен анализ образцов расщепляющегося поколения F<sub>2</sub> с помощью молекулярных маркеров, представленных в таблице 1.

Экстракцию ДНК проводили с использованием набора для выделения ДНК из растительного материала комплекта С компании Праймтех согласно протоколу производителя. Режим проведения амплификации включал следующие этапы: I-й этап: 92 °С – 15 мин.; II-й этап: 35 циклов: 99 °С – 4 сек.; 58-52 °С – 30 сек.; 72 °С – 1 мин.; III-й этап: 72 °С – 5 мин.; IV-й этап: 16 °С – 2 мин. Оценка продуктов амплификации проводилась методом электрофореза в 2% агарозном геле. Для *B* аллеля разделение продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500.

Результаты и их обсуждение. Для выявления возможности создания индетерминантных форм с аллелем *B*, тесно связанным с детерминантным типом роста, проведена оценка признаков, характеризующих развитие главного побега у гибрида F<sub>1</sub> С9464 × ЛВРН<sub>д</sub> высота растения, высота за-

ложения первой кисти, число листьев между кистями. Генотип данного гибрида сочетал аллели гена *СУСВ* *b* и *B* определяющие типы накапливаемых каротиноидов, аллели *Sr* и *sr*, определяющие тип развития главного побега.

Таблица 1. – Наименование и характеристика маркеров, используемых для ДНК-типирования популяции томатов T40 F<sub>2</sub> C9464 × ЛВРН<sub>д</sub>

Аллель	Тип и название маркера	Праймеры для ПЦР	Температура отжига, °С	Литературный источник
<i>Ph-3</i>	SCAR, NCLB-9-6678	F:CCTTAATGCAATAGGCAAAT R:ATTTGAATGTTCTGGATTGG,	52	Chunwongse J. [et al.] [6]
<i>Sp</i>	CAPS, SpF/R_ MvaI	F:CTGTCCAAGTGTTAAGATG R:CTGTAGTGCCTGGAATGT	56	А.В.Кильчевский и др. [6]
<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	CAPS, <i>hp-2<sup>dg</sup></i> AciI	F:TTCTTCGGATTGTCCATGGT R:CACCAATGCTATGTGCCAAA	55	Кильчевский, А.В и др. [7]
<i>Cf5</i>	SCAR, 2-5Cf	F:GCTATCTTTGGGTATCAAAATC TT R:AGATGACATCGACAAAATGTG	58	Кильчевский, А.В и др. [8]
<i>ps-2</i>	CAPS, <i>ps-2</i> _TaiI	F:CAAATTGGATGAGAGTTTTGA A R:CATTTTACAAGTGTAACAAC TG	55	Бабак О.Г. и др. [1]
<i>B</i>	SCAR, BpromF/Bprom R	F:CTATGTTTGTAGTGCTTGG R:GAAAATTGTTTCATGTGCC	55	А.В.Кильчевский и др. [7, 9]

Согласно полученным данным, высота растений находилась в пределах 2.80 - 3.15 м, заложение первой кисти на растениях начиналось после 8-9 листа, между кистями закладывалось по 3 листа, что полностью соответствует индетерминантным гибридам для защищенного грунта. Аналогичные данные были получены по формам F<sub>2</sub> с гетерозиготными генотипами. При этом плоды имели оранжевую окраску, что соответствует преимущественному накоплению бета-каротина. Полученные данные показывают, что при использовании детерминантной формы с гомозиготными аллелями *sr* и *B* в качестве одного из родителей возможно получение индетерминантных форм при сочетании с аллелями *Sr* и *b* в другом генотипе.

Для создания новых генотипов томата на основе ФМС с комплексом генов качества и устойчивости с применением функциональных ПЦР маркеров были протестированы 123 генотипа томата поколения F<sub>2</sub> для выявления изучаемых аллелей. В таблице 2 представлен ряд типизируемых образцов с различным сочетанием аллелей.

Типирование *B* аллеля гена *СУСВ* проводилось маркером BpromF/R. При амплификации с данными праймерами у растений, несущих рецессивный аллель данного гена (*b*), образуется фрагмент длиной 141 п.н., тогда как у растений с мутантным аллелем *B* – 150 п.н. (Табл. 2).

С целью выявления аллеля *hp-2<sup>dg</sup>* (dark green) использован CAPS маркер CAPS *hp-2<sup>dg</sup>*\_AciI. В результате ПЦР с указанным маркером синтезируется ампликон размером 697 п.н. После рестрикции эндонуклеазой *AciI*, мутантный аллель *hp-2<sup>dg</sup>* (dark green) остается неизменным, а нормальный аллель разрезается на фрагменты длиной 578 п.н. и 119 п.н. (рис.1 А).

Использование CAPS маркера *ps-2*\_TaiI позволяет получить ПЦР-фрагменты размером 397, 223, 76 п.н. у фертильных форм, и 223, 200, 197 и 76 п.н. у образцов с аллелем стерильности *ps-2*. (рис.1 Б).

Для выявления аллеля детерминантного габитуса *sr* использован маркер CAPS SpF/R\_ MvaI. В результате рестрикции у растений с неограниченным ростом (*Sp*) ампликон режется на фрагменты 396, 624 п.н, а у растений детерминантного фенотипа – остается неизменным 1020 п.н. (рис.1 В).

С целью выявления аллеля устойчивости к кладоспориозу *Cf5* применялся доминантный маркер SCAR 2-5 Cf. Продукты ПЦР размером 1163 и 880 п.н. свидетельствуют о наличии аллеля гена *Cf5* (рис.1 Г).

При амплификации с маркером NCLB-9-6678 устойчивости к фитофторе (*Ph3*) фрагменты размерами 600 и 900 п.н. свидетельствуют о наличии признака устойчивости и восприимчивости к фитофторе, соответственно (рис.).

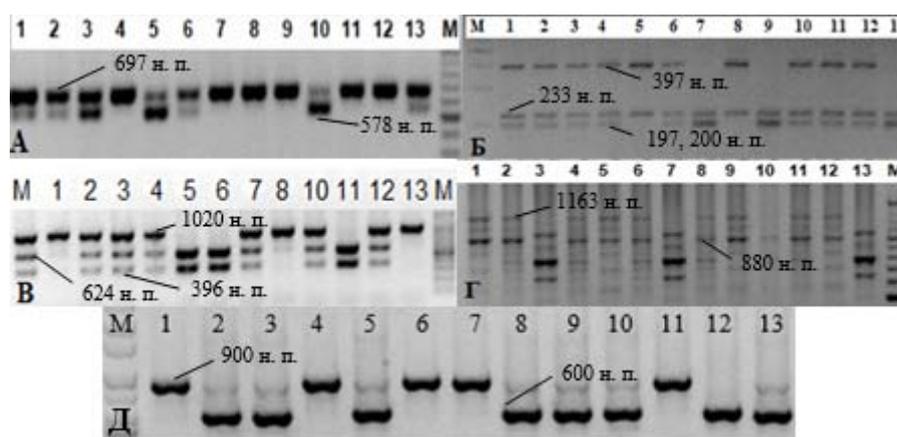


Рисунок – Продукты амплификации ДНК 13 образцов популяции T40 F<sub>2</sub> C9464 × ЛВРН<sub>д</sub> с CAPS маркером *hp-2<sup>dg</sup>F/hp-2<sup>dg</sup>R\_AciI* (А); CAPS маркером *ps-2\_TaiI* (Б); CAPS маркером *SpF/R\_MvaI* (В); SCAR маркером *2-5Cf* (Г); SCAR маркером *NCLB-9-6678* (Д)

Таблица 2. – Результаты ДНК-генотипирования образцов томата популяции F<sub>2</sub> с маркерами к генам *B*, *hp-2dg*, *sp*, *Cf2*, *Cf5*, *Ph3*, *ps-2*

Образец ДНК	Ген и размеры искомого ПЦР продукта, п.н.						Фенотипическое описание растений
	<i>B</i> , 150.	<i>hp-2<sup>dg</sup></i> , 697	<i>ps-2</i> , 200	<i>Sp</i> , 396+624	<i>Cf-5</i> , 1163+880	<i>Ph-3</i> , 600	
T40 -7	<i>b</i>	<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	<i>ps2</i>	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Картофельный лист
T40 -20	Гетеро*	<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	Гетеро	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Плоды белесые
T40 -25	<i>B</i>	<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	Гетеро	<i>sp</i>		<i>Ph-3</i>	Растение невысокое
T40 -27	<i>B</i>	Гетеро	<i>ps2</i>	<i>sp</i>		Гетеро	Очень высокое
T40 -28	<i>B</i>	<i>Hp-2<sup>dg</sup></i>	Гетеро	<i>sp</i>		<i>Ph-3</i>	Плоды белесые, листья обычные
T40 -30	Гетеро	Гетеро	<i>ps2</i>	Гетеро		Гетеро	Лист картофельный, кисть простая
T40 -42	<i>B</i>	<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	<i>ps2</i>	<i>sp</i>		Гетеро	Низкое, высота 52 см.
T40 -58	<i>b</i>	<i>Hp-2<sup>dg</sup></i>	<i>ps2</i>	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Лист картофельный, кисть простая
T40 -68	<i>b</i>	Гетеро	<i>ps2</i>	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	Гетеро	Картофельный лист, кисть простая
T40 -88	<i>B</i>	Гетеро	Гетеро	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Плоды белёдые, крупные
T40 -92	Гетеро	Гетеро	<i>ps2</i>	Гетеро	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Кисти сложные
T40 -98	<i>b</i>	<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	Гетеро	<i>Sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>ph-3</i>	Кисти сложные
T40 -103	<i>B</i>	Гетеро	Гетеро	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Очень сложная кисть, плод округлый, жёлтый
T40 -107	Гетеро	<i>Hp-2<sup>dg</sup></i>	<i>ps2</i>	Гетеро		Гетеро	Лист средний, кисть простая, плоды крупные
T40 -123	<i>B</i>	<i>hp-2<sup>dg</sup></i>	-	<i>sp</i>	<i>Cf-5</i>	<i>Ph-3</i>	Плод мелкий, наличие трещин

\* – Гетерозиготная форма

По результатам молекулярного анализа, а также фенотипического анализа образцов были отобраны 18 форм с различным сочетанием аллелей устойчивости: кладоспориозу (*Cf5*), фитофторозу (*Ph3*); качества плодов: ликопина и каротина (*b*). β-каротина (*B*), повышенного содержания пигментов (*hp-2dg*); детерминантного и индетерминантного типа роста (*sp/Sp*); функциональной мужской стерильности (*ps-2*). Наряду с молекулярным анализом оценивались признаки по фенотипу: размер и форма плода, тип кисти, наличие картофельного листа.

**Заключение.** Показана возможность создания индетерминантных форм у гибридов F<sub>1</sub> с сочетанием в генотипе генов *Self pruning* и *Beta* в гетерозиготном состоянии. На основе разработанных молекулярных маркеров и адаптированных методик ДНК-типирования аллелей качества плодов *B*,

*hp-2<sup>dg</sup>*, устойчивости к болезням *Ph-3*, *Cf-5*, типа роста главного побега *Sp*, функциональной мужской стерильности пыльников (ФМС) *ps-2* проведен скрининг популяции F<sub>2</sub> гибрида С9464 × ЛВРН<sub>д</sub>, получен селекционный материал для создания новых материнских линий на основе ФМС с преимущественным накоплением β-каротина, и устойчивостью к фитофторе, кладоспориозу. Из расщепляющейся популяции F<sub>2</sub> были отобраны стерильные (с аллелем *ps-2*) и фертильные (с аллелем *Ps-2*) образцы с сочетанием аллелей *B/hp2<sup>dg</sup>/sp/Ph3/Cf5*, *b/hp2<sup>dg</sup>/Sp/Ph3/Cf5*. Данные формы будут использованы в дальнейшем селекционном процессе, направленном на создание новых форм с высоким качеством плодов и устойчивостью к патогенам.

#### Список использованных источников

1. Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Анисимова Н.В., Яцевич К.К., Никитинская Т.В., Лещина Н.Ю., Пугачева И.Г., Никонович Т.В., Добродькин М.М., Кильчевский А.В. Создание гибридов F1 томата черри на стерильной основе с использованием методов классической и маркер-сопутствующей селекции / Сб. науч. трудов «Молекулярная и прикладная генетика», 2020. – Т.29, С. 5-17
2. Gorguet B., Schipper D., van Lammeren A., Visser R. G. F., van Heusden A. W. *ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene // *Theor Appl Genet* - 2009 – V.118 –P.1199–1209.
3. Генетические основы селекции растений а 4 т. Т4. Биотехнология в селекции растений. Генетика и гнкитическая инженерия. гл.11 Молекулярные технологии в селекции томата (*Solanum lycopersicum L.*) / А.В.Кильчевский, О.Г. Бабак, В.Ф. Аджиева, Н.А. Некрашевич С.В. Малышев, З.Ф. Грушецкая, Л.А. Мишин, М.М. Добродькин, И. Е.Зайцева, И.Г.Пугачева/ Мн.:Беларусская наука, 2014. – с.290-344.
4. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1 / L. Pnueli [et al.] // *Development*. – 1998 Jun. – Vol. 125(11). – P. 1979–1989.
5. Kolotilin, I. Transcriptional profiling of high pigment-2dg tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of phytonutrients / Igor Kolotilin [et al] // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 145. –P. 389–401.
6. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato / Chunwongse J. [et al.]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 77. – №. 3. – P. 281-286.
7. Кильчевский, А.В. ДНК-типирование генов качества плодов и устойчивости к болезням томата / А.В. Кильчевский, О.Г. Бабак, С.В. Малышев, В.Ф. Аджиева, Н.А. Некрашевич, К.К. Яцевич, А.В. Кондратюк; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Национальная академия наук Беларуси, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2016. – с. 41. – ISBN 978-985-552-526-5.
8. Генетические ресурсы растений в Беларуси: мобилизация, сохранение, изучение и использование. Гл.4, раздел 4.1.1. Генетические коллекции сельскохозяйственных культур. Томат (*Solanum lycopersicum L.*) и перец (*Capsicum annuum L.*) / Кильчевский А.В., Бабак О.Г., Аджиева В.Ф., Никитинская Т.В., Некрашевич Н.А., Яцевич К.К./ – Минск: Четыре четверти, 2019. – с.167-175.
9. Babak O.G., Nekrashevich N.A., Yatsevich K.K., Malyshev S.V., Kilchevsky A. V. Genetic bases of tomato marker-assisted selection in Belarus. *Eurobiotech. J.* 2018; 2(2):128-135, doi:10.2478/ebtj-2018-0017.

УДК 582.287.238:577.175.1:577.29

### ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ЭКСТРАКТА МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

О.Н. Жук, Д.А. Слиж, В.В. Сакович

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

Высшие базидиомицеты вызывают интерес как источники биологически активных соединений. Основной целью является создание на основе грибов и продуктов их метаболизма лекарственных препаратов, пищевых и кормовых добавок. Подтверждением служит большое число экспериментальных исследований по высшим грибам.

В научной литературе имеются убедительные доказательства благоприятного влияния брассиностероидов (БС) – фитогормонов класса стероидов на растения. Их регуляторная роль проявляется в стимуляции процессов роста, интенсивности фотосинтеза, изменения белкового метаболизма и многих других сторон обмена веществ [1]. Влияние БС на рост и развитие культуры и плодовых тел мицелиальных грибов практически не изучено, хотя в силу значительного сходства между грибами и растениями такая постановка вопроса вполне оправдана. Особый интерес с фундаментальной и практической сторон представляет изучение действия БС на рост и развитие мицелиальных грибов в глубинной культуре. Этот биотехнологический метод позволяет не только круглогодично получать мицелий культивируемого гриба, но и выделять из него и из культуральной жидкости синтезируемые мицелием вторичные биологически активные метаболиты, в том числе и протеолитические ферменты.

Целью нашего исследования являлось изучение влияния БС на протеолитическую активность культуральной жидкости и экстракта мицелия вешенки обыкновенной.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на штамме 491 *Pleurotus ostreatus*, который был выделен из плодовых тел, выросших на тополе (*Populus sp.*). Исследуемые образцы брассиностероидов были синтезированы в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Для получения глубинной культуры использовали фрагменты поверхностной культуры мицелия площадью 1 см<sup>2</sup> на 100 мл питательной картофельно-сахарозной среды (КСС), с добавлением 24-ЭК в концентрациях 10<sup>-7</sup> М, 10<sup>-9</sup> М и 10<sup>-12</sup> М. Культивирование велось в течение 14 суток в темноте при температуре 27 °С на шейкере модели WiseShakeSHO при 70 об/мин. Способность гриба влиять на кислотность питательной среды, оценивали по изменению рН культуральной жидкости. Протеолитическую активность определяли по методике, описанной в работе [2]. Все эксперименты выполняли в шести повторах.

**Результаты и обсуждение.** Степень влияния брассиностероида 24-ЭК в концентрациях 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-9</sup> и 10<sup>-12</sup> М на накопление биомассы вешенки обыкновенной при глубинном культивировании на питательной среде КСС в течение 14 суток анализировалась по массе влажного мицелия (таблица 1).

Таблица 1. – Влияние 24-ЭК на накопление влажной биомассы *P. ostreatus* (14 сутки *in vitro*)

Концентрация брассиностероида, М	Масса влажного мицелия <i>P. ostreatus</i> , г
Контроль	17,37±0,12
24-ЭК 10 <sup>-7</sup>	39,04±0,10
24-ЭК 10 <sup>-9</sup>	17,01±0,11
24-ЭК 10 <sup>-12</sup>	23,98±0,10

Выявлено, что к 14 суткам масса влажного мицелия в контроле достигла 17,37±0,12 г, при наличии в питательной среде 24-ЭК в концентрациях 10<sup>-7</sup> М и 10<sup>-12</sup> М масса мицелия составила 39,04±0,10 г и 23,98±0,10 г, соответственно. При внесении 24-ЭК 10<sup>-9</sup> биомасса *P. ostreatus* соответствовала значениям контроля,

Таким образом, исследуемый эпикастастерон оказывает влияние на рост мицелия и это влияние является дозозависимым – максимальный эффект выявлен при концентрации 10<sup>-7</sup> М.

Метаболическая активность вешенки обыкновенной контролировалась по изменениям рН культуральных сред в течение срока исследования – 14 суток (таблица 2). рН среды на начало эксперимента (во время внесения посевного материала) составил 5,5±0,01.

Таблица 2. – Изменение рН среды под влиянием брассиностероидов

Образец	рН на начало эксперимента	рН на 14 сутки эксперимента
КЖ – Контроль	5,5±0,01	7,47±0,17
КЖ +24-ЭК 10 <sup>-7</sup> М	5,5±0,01	6,13±0,16
КЖ +24-ЭК 10 <sup>-9</sup> М	5,5±0,01	6,05±0,14
КЖ +24-ЭК 10 <sup>-12</sup> М	5,5±0,01	6,36±0,13

В контрольной культуре вешенки обыкновенной к 14 суткам произошел сдвиг рН в нейтральную сторону (с  $5,5 \pm 0,01$  до  $7,47 \pm 0,17$ ). 24-ЭК во всех использованных концентрациях сдерживал изменение рН питательной среды. Причины, лежащие в основе данного факта, остаются неясными.

Протеолитическая активность метаболитов экстракта мицелия (ЭМ) имеет высокую активность по отношению к субстрату желатин (таблица 3). При добавлении 28-ГК она возрастает. Эффект имеет концентрационную зависимость – наиболее выраженный был получен при концентрации  $10^{-9}$  М: активность возросла в 1,7 раза; при концентрации  $10^{-12}$  М – в 1,3 раза, при концентрации  $10^{-7}$  М – в 1,14 раза. 24-ЭК вызвал повышение желатинолитической активности только в концентрации  $10^{-9}$  М – она увеличилась более чем в 2,3 раза.

Таблица 3. – Протеолитическая активность (ПА) протеиназ экстракта мицелия *P. ostreatus* по отношению к желатину

Источник протеиназ	Концентрация белка, мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Экстракт мицелия	$1,05 \pm 0,03$	84,5	101,4
ЭМ + 28ГК $10^{-7}$	$1,06 \pm 0,02$	109,1	115,65
ЭМ + 28ГК $10^{-9}$	$1,05 \pm 0,1$	165,9	<b>174,2</b>
ЭМ + 28ГК $10^{-12}$	$1,04 \pm 0,07$	128,8	133,95
ЭМ + 24ЭК $10^{-7}$	$1,06 \pm 0,04$	85,7	90,84
ЭМ + 24ЭК $10^{-9}$	$1,04 \pm 0,02$	229,6	<b>238,78</b>
ЭМ + 24ГК $10^{-12}$	$1,05 \pm 0,04$	92,02	96,62

При использовании 28-ГК наблюдалось увеличение выхода протеиназ в культуральную жидкость (КЖ) (таблица 4). Эффект имеет концентрационную зависимость. Наилучшие показатели были при концентрации  $10^{-9}$  М – произошло увеличение выхода внеклеточных протеиназ в 3,15 раза, при концентрации  $10^{-12}$  М – в 1,45 раза, при концентрации  $10^{-7}$  М – в 1,89 раза.

24-ЭК привел к увеличению синтеза внеклеточных желатинолитических протеиназ в концентрациях  $10^{-9}$  М и  $10^{-12}$  М, при этом активность возросла более, чем в 1,9 раз.

Таблица 4. – Протеолитическая активность протеиназ культуральной жидкости *P. ostreatus* по отношению к желатину

Источник протеиназ	Концентрация белка, мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Культуральная жидкость	$0,185 \pm 0,034$	70,45	13
КЖ + 28ГК $10^{-7}$	$0,191 \pm 0,02$	128,85	24,6
КЖ + 28ГК $10^{-9}$	$0,187 \pm 0,023$	219,5	<b>41</b>
КЖ + 28ГК $10^{-12}$	$0,189 \pm 0,012$	100,15	18,9
КЖ + 24ЭК $10^{-7}$	$0,192 \pm 0,04$	69,85	13,4
КЖ + 24ЭК $10^{-9}$	$0,187 \pm 0,022$	132,3	24,74
КЖ + 24ГК $10^{-12}$	$0,184 \pm 0,13$	138,1	25,4

При использовании 28-ГК наблюдалось незначительное увеличение активности протеиназ экстракта мицелия, вызывающих лизис казеина (таблица 5). Наилучший результат был получен при концентрации  $10^{-12}$  М: активность увеличилась в 1,13 раза. 24-ЭК также привел к некоторой активности казеинолитических протеиназ в концентрациях  $10^{-7}$  М и  $10^{-12}$  М: активность протеолитических ферментов увеличилась в 1,17 раза.

При применении 28-ГК наблюдалось увеличение выхода в культуральную жидкость протеиназ, вызывающих лизис казеина (таблица 6). Эффект имеет концентрационную зависимость. Наибольший выход казеинолитических внеклеточных протеиназ наблюдался при концентрации  $10^{-9}$  М: выход протеолитических ферментов увеличился в 2,78 раза. При концентрации  $10^{-12}$  М выход протеиназ увеличился незначительно – в 1,24 раза. 24-ЭК привел к увеличению синтеза внеклеточных казеинолитических протеиназ только в концентрации  $10^{-9}$  М, при этом активность возросла в 1,3 раза. Можно заключить, что и 28-ГК $10^{-9}$  М и 24-ЭК  $10^{-9}$  М стимулируют выход протеиназ, лизирующих желатин и казеин, из экстракта мицелия в культуральную жидкость.

Таблица 5. – Протеолитическая активность протеиназ экстракта мицелия *P. ostreatus* по отношению к казеину

Источник протеиназ	Концентрация белка, мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Экстрактмицелия	1,05±0,03	86,6	90,93
ЭМ + 28ГК10 <sup>-7</sup>	1,06±0,02	91,45	96,937
ЭМ + 28ГК10 <sup>-9</sup>	1,05±0,1	83,55	87,73
ЭМ+ 28ГК10 <sup>-12</sup>	1,04±0,07	99,2	103,168
ЭМ + 24ЭК10 <sup>-7</sup>	1,06±0,04	105,6	111,94
ЭМ + 24ЭК10 <sup>-9</sup>	1,04±0,02	80,25	83,46
ЭМ + 24ГК10 <sup>-12</sup>	1,05±0,04	102,05	107,153

Таблица 4 – Протеолитическая активность протеиназ культуральной жидкости *P. ostreatus* по отношению к казеину

Источник протеиназ	Концентрация белка мг/мл	ПА, ед/мл	Удельная ПА
Культуральная жидкость	0,185±0,034	82,35	15,2
КЖ+ 28ГК10 <sup>-7</sup>	0,191±0,02	74,85	14,15
КЖ+ 28ГК10 <sup>-9</sup>	0,189±0,012	236,95	<b>42,3</b>
КЖ+ 28ГК10 <sup>-12</sup>	0,187±0,023	101,45	18,97
КЖ+ 28ГК10 <sup>-9</sup>	0,192±0,04	88,45	16,98
КЖ+ 24ЭК10 <sup>-9</sup>	0,187±0,022	107,85	20,167
КЖ+ 24ГК10 <sup>-12</sup>	0,184±0,13	83,6	15,38

Таким образом, исследуемый БС (24-ЭК) дозозависимо стимулирует нарастание массы мицелия *P. ostreatus* в глубинной культуре, снижает скорость изменения рН в нейтральную сторону по сравнению с контролем, незначительно повышает протеолитическую способность экстракта мицелия и дозозависимо способствует выходу казеинолитических и желатинолитических протеиназ из мицелия в культуральную жидкость.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант БРФФИ Б20-143.*

#### Список использованных источников

- Zhabinskii, V.N. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom / Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. // Steroids. – Volume 97, 2015. – P. 87-97.
- Дьяконова, Г. В. Исследование некоторых физико-химических свойств молокосвертывающих ферментов вешенки обыкновенной: автореф. диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 03.01.04 ВАК РФ, биохимия. / Г.В. Дьяконова; Кубанский государственный аграрный университет. Ростов-на-Дону. – 2010. – 44 с.

УДК 759.873.088.5:661.185

### ВЛИЯНИЕ КОНКУРЕНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241

**Н.С. Иванов, А.А. Ярова, Т.П. Пирог**

*Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, info@nuft.edu.ua*

**Актуальность.** Резистентность к антибиотикам вызывает большую обеспокоенность, поскольку приводит к глобальным рискам для здоровья населения, а также экологическим рискам. Наличие в окружающей среде устойчивых к антибиотикам генов и устойчивых к антибиотикам бактерий существенно повышает распространение резистентности к антибиотикам [1].

Для решения этих проблем осуществляются исследования в нескольких направлениях: во-первых, поиск альтернативных антибиотикам веществ природного происхождения, к которым относятся и нетоксичные биодegradабельные микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ)

[2]; во-вторых, совместное культивирование продуцентов антимикробных соединений с конкурентными микроорганизмами (биологическими индукторами) для повышения антимикробной активности и/или синтеза целевого продукта [3,4].

Ранее было установлено, что *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 синтезирует комплекс поверхностно-активных амино- и гликолипидов на очищенном глицерине и отходах производства биодизеля. Культивирование штамма ИМВ В-7241 на отходах производства биодизеля сопровождалось повышением концентрации поверхностно-активных веществ в два раза, однако снижением их антимикробной и антиадгезивной активности по сравнению с выращиванием на очищенном глицерине [5].

Интерес к отходам производства биодизеля как субстрата для использования в биотехнологических процессах [6] обусловлен тем, что на сегодняшний день хранение этих токсичных промышленных отходов является потенциальной экологической проблемой из-за повышенной щелочности и содержания остатков токсичного метанола, высоких концентраций солей и свободных жирных кислот.

**Цель работы:** исследовать влияние конкурентных микроорганизмов на биологическую активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных на глицерине различной степени очистки.

**Изложение основных результатов исследования.** Штамм *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 изолирован из загрязненной нефтепродуктами почвы [7]. В качестве индуктора использовали и почвенный штамм *Bacillus subtilis* БТ-2. Индуктор вносили в среду культивирования продуцента ПАВ в виде живых или инактивированных автоклавированием клеток, а также в виде супернатанта.

В табл. 1 представлены данные по действию на бактерии поверхностно-активных веществ, синтезированных *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в присутствии индукторов. Эти данные свидетельствуют о том, что наиболее эффективным индуктором оказались живые клетки *B. subtilis* БТ-2: внесение их в среду с обоими субстратами сопровождалось синтезом ПАВ, минимальные ингибирующие концентрации которых по отношению к бактериальным тест-культурам были в 2-20 раз ниже, чем установленные для поверхностно-активных веществ, полученных без индуктора.

Использование в качестве индуктора инактивированных клеток *B. subtilis* БТ-2 позволило повысить антимикробную активность ПАВ по отношению к бактериям в 2-8 раз по сравнению с показателями для поверхностно-активных веществ, синтезированных в среде без индуктора. Отметим, что ПАВ, полученные в присутствии *B. subtilis* БТ-2, характеризовались высокой антимикробной активностью не только по отношению к этому биологическому индуктору, но и другим грамположительным (*S. aureus* БМС-1) и грамотрицательным (*P. vulgaris* ПА-12, *E. cloacae* С-8) бактериям. Наименее эффективным из исследуемых индукторов оказался супернатант: антибактериальная активность ПАВ, синтезируемых в его присутствии, была ниже, чем препаратов, полученных при наличии в среде культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 живых и инактивированных клеток *B. subtilis* БТ-2 (табл. 1)

Таблица 1. – Антибактериальная активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных при наличии биологических индукторов

Субстрат для синтеза ПАВ	Биологический индуктор	Минимальные ингибирующие концентрации (мкг/мл) по отношению			
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (споры)	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8
Очищенный глицерин	Контроль (без индуктора)	2,8	2,8	5,6	5,6
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,23	0,23	1,84	0,46
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,4	1,4	1,4	0,7
	Супернатант	1,4	2,8	2,8	1,4

## Окончание таблицы 1

Отходы производства биодизеля	Контроль (без индуктора)	9,8	4,9	9,8	19,6
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,85	0,85	1,7	0,85
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,2	2,2	2,2	4,4
	Супернатант	4,6	2,3	4,6	18,4

Примечание – При определении минимальных ингибирующих концентраций погрешность не превышала 5%.

Данные по исследованию действия ПАВ, синтезированных в присутствии индукторов, на дрожжи рода *Candida* представлены в табл. 2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование в качестве индукторов живых клеток *B. subtilis* БТ-2 сопровождалось синтезом ПАВ с высокой антифунгальной активностью (МИК 1,87-7,0 мкг/мл), менее эффективными индукторами оказались инактивированные клетки (МИК 2,8-9,0 мкг/мл), а супернатант практически не оказывал положительного эффекта на антифунгальную активность синтезированных в его присутствии ПАВ.

Таблица 2. – Антифунгальная активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных при наличии биологических индукторов

Субстрат для синтеза ПАВ	Биологический индуктор	Минимальные ингибирующие концентрации (мкг/мл) по отношению	
		<i>Candida tropicalis</i> PE-2	<i>Candida albicans</i> Д-6
Очищенный глицерин	Контроль (без индуктора)	11,2	11,2
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,87	3,75
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,8	5,6
	Супернатант	11,2	11,2
Отходы производства биодизеля	Контроль (без индуктора)	19,7	19,7
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	3,5	7,0
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	4,5	9,0
	Супернатант	9,2	18,4

Примечание – При определении минимальных ингибирующих концентраций погрешность не превышала 5%.

Отметим, что и литературные данные по эффективности использования в качестве индукторов живых, инактивированных клеток или соответствующего супернатанта существенно отличаются. Так, в работе [8] отмечается, что спектр метаболитов, синтезированных актинобактериями в присутствии живых клеток индукторов, был шире, чем при использовании инактивированных тепловой обработкой клеток.

Использование живых клеток *Pseudomonas* sp. в качестве индукторов при культивировании *Streptomyces* sp. МА37 сопровождалось образованием нескольких новых метаболитов, не синтезированных монокультурами [9]. В то же время синтез феназина *Pseudomonas aeruginosa* повышался практически одинаково независимо от физиологического состояния (живые или инактивированные клетки) индукторов *Escherichia coli*, *B. subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Использование в качестве индуктора супернатанта *Streptomyces bullii* C2 не оказывало положительного влияния на синтез антимикробных веществ грибом *Aspergillus fumigatus* МВС-F1-10, в то время как при наличии живых клеток индуктора наблюдали синтез девяти новых антимикробных метаболитов, не хаарктерных для монокультуры продуцента. Такие данные свидетельствуют о различных механизмах, лежащих в основе повышения синтеза или активности антимикробных веществ, синтезированных при действии индукторов.

Полученные нами данные по более высокой эффективности живых клеток индуктора по сравнению с инактивированными или супернатантом могут свидетельствовать о том, что индуцирующий фактор связан с клетками, а индукция требует как химического, так и биологического взаимодействия между продуцентом ПАВ и конкурентным микроорганизмом.

**Вывод.** Таким образом, в результате проведенной работы установлена возможность регуляции антимикробной активности поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 внесением в среду культивирования продуцента клеток конкурентных бактерий *B. subtilis* БТ-2. Важно, что в таких условиях культивирования существенно повышается антимикробная активность поверхностно-активных веществ, синтезированных на токсичных промышленных отходах производства биодизеля.

#### Список использованных источников

1. Lin, Z., Yuan, T., Zhou, L., Cheng, S., Qu, X., Lu, P., Feng, Q. (2021). Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(5), 1741–1758. doi: 10.1007/s10653-020-00759-0.
2. Ceresa, C., Fracchia, L., Fedeli, E., Porta, C., Banat, I.M. (2021). Recent advances in biomedical, therapeutic and pharmaceutical applications of microbial surfactants. *Pharmaceutics*, 13(4), 466. Doi: 10.3390/pharmaceutics13040466.
3. Alves A.R., Sequeira A.M., Cunha Â. (2019). Increase of bacterial biosurfactant production by co-cultivation with biofilm-forming bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. Doi: 10.1111/lam.13169.
4. Hifnawy S.M., Hassan H.M., Mohammed R., Fouda M.M., Sayed A.M., Hamed A.A., Abdelmohsen U.R. (2020). Induction of Antibacterial Metabolites by Co-Cultivation of Two Red-Sea-Sponge-Associated Actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs*, 18(5), 243. doi: 10.3390/md18050243.
5. Pirog, T.P., Lutsay, D.A., Kliuchka, L.V., Beregova, K.A. (2019). Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnologia Acta*, 12(1), 39–57. doi: 10.15407/biotech12.01.039.
6. Hasan M.M., Rahman M.M. (2017). Performance and emission characteristics of biodiesel–diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 938–948. doi: 10.1016/j.rser.2017.03.045.
7. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. (2009). Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ. *Прикл. биохимия и микробиология*. 45 (3): 304-310.
8. Liang, L., Wang, G., Haltli, B., Marchbank, D.H., Stryhn, H., Correa, H., Kerr, R.G. (2020). Metabolomic comparison and assessment of co-cultivation and a heat-killed inducer strategy in activation of cryptic biosynthetic pathways. *Journal of Natural Products*, 83(9), 2696–2705. Doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00621.
9. Maglangit F., Kyeremeh S., Ebel D. (2020). A Co-Culturing Approach Enables Discovery and Biosynthesis of a Bioactive Indole Alkaloid Metabolite. *Molecules*, 25(2), 256. Doi:10.3390/molecules25020256
10. Luti, K.J.K., Yonis, R.W. (2013). Elicitation of *Pseudomonas aeruginosa* with live and dead microbial cells enhances phenazine production. *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (6), 8769–8778.
11. Rateb, M.E., Hallyburton, I., Houssen, W.E., Bull, A.T., Goodfellow, M., Santhanam, R., Jaspars M., Ebel, R. (2013). Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances*, 3(34), 14444. doi:10.1039/c3ra42378f.

УДК 582.287.238:577.175.1

#### О ПРОТЕИНАЗАХ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PLEUROTUS OSTREATUS*)

А.Д. Кульгавеня, И.А. Ильючик, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

В настоящее время выявлен существенный дефицит белка в рационе питания населения, а стоимость высококачественных животных белков непрерывно растет [1]. Дефицит белка четко проявился и в кормлении сельскохозяйственных животных. По данным экспертов проекта «Протеин России» недостаток кормовых белков составляет 770 тыс. тонн, а общий дефицит белков в России – 2 млн. тонн/год. Это обуславливает проблему поиска альтернативных источников белка [2].

Одним из альтернативных источников белка являются грибы, содержащие 30–50% белков с аминокислотным составом сопоставимым с рекомендациями ФАО (FAO). Более того, грибы достаточно богаты витаминами, в первую очередь группы В и целым рядом других биологически активных субстанций [3].

В Беларуси для употребления в пищу культивируют вешенку обыкновенную – *Pleurotus ostreatus*. Она отличается быстрым ростом и высоким выходом плодовых тел, обладает хорошими пищевыми качествами, содержит большое количество сбалансированного по аминокислотному составу белка, богата целым рядом ценных биологически активных веществ [4, 5].

Интенсификация технологии глубинного культивирования мицелия гриба диктует необходимость детального уяснения механизмов регуляции метаболизма как основы жизнедеятельности. Одним из генеральных механизмов регуляции является протеолиз.

Более того, грибы обладают разнообразным набором энзимов, включая протеиназы. Это делает их привлекательными в качестве сырья для получения препаратов протеиназ, потребность в которых испытывает ряд отраслей промышленности, сельского хозяйства и медицины.

Среди агарикоидных грибов *P. ostreatus* отличается наибольшей протеолитической активностью [6]. Она продуцирует несколько внеклеточных протеаз, которые, как полагают, участвуют, в частности, в регуляции лигнинолитической активности этого гриба.

В настоящем сообщении нами представлена краткая справка о состоянии исследований набора протеиназ указанного гриба.

Гомогенные образцы сериновой протеиназы (*ProA*, ЕС 3.4.22.9) и двух металлоэндопептидаз (*ProB*, ЕС 3.4.99.32 и *ProC*, ЕС 3.4.24.4) выделены из плодовых тел *P. ostreatus* [7, 8]. *ProA* оказалась сериновой протеиназой с мол. массой 30 кДа, обладающей также амидолитической и эстеролитической активностями и катализирующей расщепление преимущественно пептидных связей с участием карбоксильных групп гидрофобных аминокислотных остатков в окисленной В-цепи бычьего инсулина. *ProB* представляет собой цинк-содержащий энзим с мол. массой 18 кДа, не содержащий лизина. Он полностью инактивируется ЭДТА и 1,10-фенантролином, а лишённую  $Zn^{2+}$  *ProB* можно реактивировать  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  или  $Mn^{2+}$ . Специфическое расщепление связи  $Pro_{29}-Lys_{30}$  в окисленной В-цепи инсулина быка, преимущественное образование лизилпептидов из белков при протеолизе и высокая чувствительность к энзиму полилизина предполагают, что *ProB* специфически расщепляет пептидные связи, включающие  $\alpha$ -аминогруппу остатков лизина. *ProC* – металлоэндопептидаза с мол. массой 42,5 кДа.  $Zn^{2+}$  из ионов двухвалентных металлов был наиболее эффективен для реактивации протеиназы, инактивированной ЭДТА [9].

Из плодовых тел указанного гриба выделен энзим мол. массой 97 кДа по данным гель-хроматографии и 48,5 кДа по данным SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, т.е. это димер. Гидролиз энзимом Leu-pNA был чувствителен к йодацетату, *p*-хлормеркурибензоату, N-этилмалеимиду и  $HgCl_2$ . Это свидетельствует о его принадлежности к цистеиновым пептидгидролазам [10].

Выделена из культуральной жидкости (питательная среда – картофельно-декстрозный бульон с дрожжевым экстрактом) и описана внеклеточная протеаза *PoSI*. Это – мономерный гликопротеин мол. массой 75 кДа, рI 4,5 и рН-оптимумом в щелочной среде. Судя по ингибиторному анализу, *PoSI* является сериновой протеазой. Энзим расщеплял ряд нитроанилидных и эфирных субстратов (SucAAPFpNA, SucAAPLpNA, TAME, BTEE), а также азоколлаген. Исследования показали, что *PoSI* является субтилизин-подобной пептидгидролазой. Предполагают, что она играет ключевую роль в регуляции активности лакказы *P. ostreatus* путем деградации и /или активации различных изоформ [11].

Фибриногенолитическая протеаза (*PoFE*) была очищена из полученного в глубинной культуре мицелия *P. ostreatus* (синтетическая питательная среда, с глюкозой и экстрактом дрожжей). *PoFE* эффективно гидролизовала фибриноген, предпочитательно переваривая  $\alpha$ A-цепь и  $\beta$ B-цепь. Активность этой протеиназы возрастала в присутствии  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  и сильно и подавлялась ЭДТА. Она имела высокую специфичность по хромогенному субстрату S-2586 для химотрипсина. Считают, что этот энзим – химотрипсин-подобная металлопротеиназа [12].

Позднее из глубинной культуры гриба (синтетическая питательная среда, с глюкозой и соевым молоком) был выделен еще один фибриногенолитический энзим, способный гидролизовать фибриноген, расщепляя  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, а затем –  $\gamma$ -цепи фибриногена, а также активировать пламиноген в плазмин [7].

Изложенное демонстрирует наличие в литературе весьма немногочисленных публикаций о протеолитическом потенциале *P. ostreatus*, тем более, что набор протеиназ существенно зависит от состава питательной среды и условий культивирования.

Нами впервые установлено, что мицелий и культуральная жидкость *P. ostreatus* при культивировании на питательной среде отвар «картофеля+сахароза» обладают протеолитической активностью при pH 7,4 по отношению к гемоглобину, желатину, казеину и фибриногену. Протеолитическая активность мицелия уменьшалась в ряду: желатин > казеин > фибриноген > гемоглобин [13]. А протеолитическая активность культуральной жидкости вешенки – в ряду: желатин > казеин > гемоглобин > фибриноген. Протеолиз желатина, казеина и фибриногена интенсивнее реализовался мицелием гриба, а культуральной жидкостью интенсивнее расщеплялся только гемоглобин [13].

При этом желатинолитическая активность проявлялась в широком диапазоне pH и была наиболее высока в диапазоне pH 5,8–8,0 с дополнительными максимумами при pH 9,0 и 10,5. Казеинолитическая активность протеиназ мицелия имела иную pH-зависимость: выявлены три зоны pH, в которых эта активность достигала максимума – 2,8–3,0, 4,5–5,0 и 7,0–8,0. Вместе с тем при увеличении pH выше 8,0 значительного роста казеинолитической активности не обнаружено. Что касается протеиназ культуральной жидкости, то pH-зависимость желатинолитической активности была близка таковой гомогенатов мицелия гриба [14, 15].

Ингибиторный анализ показал, что желатинолитическая активность умеренно (на 38–61%) угнеталась диизопропилфосфатом и реагентами, связывающими металлы. Активность «щелочных» желатиназ полностью подавлялась диизопропилфторфосфатом, *p*-хлормеркурибензоатом и *o*-фенантролином. Казеинолитическая активность при pH 2,8 и 5,2 полностью угнеталась пепстатином, а при pH 5,2 – и ЭДТА. При pH 7,6 казеинолитическая активность полностью подавлялась диизопропилфосфатом и *p*-хлормеркурибензоатом. Судя по ингибиторному анализу, желатинолитическая и казеинолитическая активность культуральной жидкости обусловлена, в основном, сериновыми протеиназами [15].

Вместе с тем было обнаружено, что желатинолитическая активность протеиназ мицелия вешенки с pH-оптимумом при 9,2 и протеиназ культуральной жидкости с pH-оптимумом при 7,6 была слабо чувствительна ко всем использованным нами в исследовании группоспецифическим ингибиторам [15]. Это позволяет предположить наличие во всем многообразии протеиназ данного гриба протеиназ иного типа, природа которых нуждается в дальнейших исследованиях.

Ранее нами и при изучении очищенных коммерческих образцов белков-ингибиторов протеиназ: ингибитора трипсина из соевых бобов (SBTI), овомукоида и овоингибитора также были описаны проявления необычных свойств протеолитической активности образцов указанных белков-ингибиторов. Кроме того, в некоторых случаях был обнаружен еще один необычный эффект – активация протеолиза в присутствии фенилметилсульфонилфторида [16, 17].

Следовательно, принимая во внимание разнообразие живых организмов, вероятно, существуют в сравнении с известными группами протеиназ иные пептидгидролазы, активный центр которых не подавляется обычно используемыми в экспериментах группоспецифическими ингибиторами. Это открывает перспективы дальнейших исследований структуры и функциональных особенностей подобных энзимов. Что касается мицелиальной культуры *P. ostreatus*, то совершенно ясно, что состав питательной среды будет существенно влиять на набор протеиназ, и это может быть в дальнейшем использовано для направленного изменения арсенала этих энзимов.

#### Список использованных источников

1. Кудинов, П.И. Современное состояние и структура мировых ресурсов растительного белка / П.И. Кудинов, Т.В. Щеколдина, А.С. Слизькая // Известия вузов. Пищевая технология. – 2012. – № 5–6. – С. 7–10.
2. Рождественская, Л.Н. Анализ вызовов и современных тенденций развития технологий на рынке белков / Л.Н. Рождественская, Е.С. Бычкова, А.Л. Бычков // Пищевая промышленность. – 2018. – № 5. – С. 42–47.
3. Ritala, A. Single cell protein – state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016 / A. Ritala, S.T. Häkkinen, M. Toivari, M.G. Wiebe // Frontiers in Microbiol. – 2017. – Vol. B. art. 2009. – P. 1–18.
4. Стахеев, И.В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина / И.В. Стахеев, Э.И. Коломиец, Н.А. Здор // Минск: «Навука і тэхніка». – 1991. – 264 с.

5. Järvinen, R. Physiological effect of Pekilo single cell protein in pigs / R. Järvinen, R. Savonen, A. Ahlström // *Agricultural and Food Science*. – 1980. – Vol. 52. – P. 14–23.
6. Gregori, A. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotusspp.* // A. Gregori, M. Svagelj, J. Pohleven // *Food Technology Biotechnology* – 2007 – Vol. 45, N. 3, P. 238-249.
7. Liu, X.L. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Pleurotus ostreatus* / X.L. Liu [et al.] // *J Microbiol Biotechnol.* – 2014. – V. 24(2): P. 245-253.
8. Pillai, S. ATP Activation of parathyroid hormone cleavage catalyzed by cathepsin D from bovine kidney / S. Pillai, R. Botti, J. E. Zull // *J. Biol. Chem.* – 1983 – Vol. 258, P. 9724–9728.
9. Dohmae, N. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies / N. Dohmae [et al.] // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1995. – V. 59(11): P. 2074-2080.
10. Shin, H.H. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus* / H.H. Shin, H.S. Choi // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 1998. – V. 62(7): P.1416-1418.
11. Palmieri, G. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus* / G. Palmieri [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2001. – V. 67(6): P.2754-2749.
12. Shen, MH. Purification, characterization, and cloning of fibrinolytic metalloprotease from *Pleurotus ostreatus* mycelia / MH. Shen [et al.] // *J Microbiol Biotechnol.* – 2007. – Aug;17(8): P. 1271-1283.
13. Жук, О. Н. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / О. Н. Жук [и др.] // *Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук.* – 2017. – № 2. – С. 62–68.
14. Кульгавеня, А. Д. О рН-зависимости протеиназ гриба вешенка обыкновенная (*pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании // А. Д. Кульгавеня // *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XIII международной молодежной научно-практической конференции, Пинск, 5 апреля 2019 г.: в 3-х ч. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2019. – Ч. 3. – С. 60-62.*
15. Кульгавеня, А. Д. Протеолитическая активность мицелиальной культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании / А.Д. Кульгавеня, В.Н. Никандров // *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук* – 2020. – № 1. – С. 12-23.
16. Никандров, В. Н. Регуляторные белки: функциональные свойства молекул и механизмы их биологического действия / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Известия НАН Беларуси. Серия мед.-биол наук.* 2003. – № 3. – С. 75-89.
17. Никандров, В. Н. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты / В.Н. Никандров, Н.С. Пыжова // *Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук.* 2008. – № 1. – С. 4–22.

УДК 633.112.9:631.527

## **ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЕЙ SSR ЛОКУСОВ НА ОТЗЫВЧИВОСТЬ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* У ГЕНОТИПОВ ТРИТИКАЛЕ**

**Е.В. Лагуновская**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси*

Для успешного осуществления современных селекционных программ важное значение имеет поиск и создание нового исходного материала. При этом получение селекционного материала с необходимыми свойствами применительно к отдельным семействам, таким как злаки, является трудновыполнимой задачей [1].

Тритикале является одной из основных зернофуражных культур Республики Беларусь. Зерно тритикале в основном используется на фураж, а также представляет ценность в качестве технического сырья для крахмального и спиртового производства. В последние годы в связи с высоким качеством новых сортов, созданных белорусскими селекционерами, тритикале с успехом применяется в хлебопекарной промышленности при изготовлении хлеба и печенья [2].

Метод культуры пыльников *in vitro* используется в различных селекционных программах для создания гомозиготных линий на основе гибридов ранних поколений. Однако выход гаплоидных растений-регенерантов в культуре пыльников у злаков, в частности, у тритикале, крайне низкий и часто исчисляется долями процентов, причем значительная их часть представлена хлорофилл-дефектными формами, способными существовать непродолжительное время и исключительно в культуральных условиях [3]. Выявление сортов и линий, обладающих способностью к андрогенезу *in vitro*, до введения их в культуру клеток способствует повышению эффективности метода культуры пыльников. Основным фактором, определяющим такую способность, является генотип [4]. Установлено, что на способность к индукции каллусогенеза и регенерации растений у тритикале оказывают влияние преимущественно хромосомы А- и В-геномов. Также известно, что различные параметры пыльцевого эмбриогенеза (частота возникновения эмбриогенных структур, регенерация альбиносных и зеленых растений, и т.д.) наследуются независимо друг от друга [5, 6]. Однако, поскольку в контроль процессов андрогенеза *in vitro* вовлечено значительное число генов, большая часть которых неизвестна, провести скрининг отзывчивых в культуре пыльников форм по генотипу достаточно затруднительно. Микросателлитные локусы могут быть сцеплены с интересующими исследователя признаками и использоваться в качестве маркеров при отборе генотипов с заданными свойствами. Для выявления такой связи применяют метод расщепляющихся популяций  $F_2$ , полученных от скрещивания родителей, контрастных по проявлению признака, с дальнейшим анализом расщепления в  $F_2$  как по анализируемому признаку, так и по аллельному состоянию микросателлитных локусов, расположенных на тех же хромосомах, что и локусы, связанные со способностью к эмбриогенезу *in vitro*, и оценивают степень корреляции между изучаемыми параметрами.

Объектом нашего исследования служили сорта, линии удвоенных гаплоидов и гибридные генотипы тритикале. Для культивирования пыльников срезанные колосья выдерживали в течение 7 дней при + 4°C, пыльники изолировали на стадии поздних одноядерных микроспор и культивировали по методике [7]. Разделение на группы индивидуальных растений в пределах каждой гибридной популяции осуществлялось следующим образом: для параметра «выход эмбриоидов» низкими считали значения – 0-10,0 %, средними – 11,0-50,0 %, высокими 51,0-90,0 %. Для параметра «выход растений-регенерантов» низкими считали значения 0-2,0 %, средними – 3,0-9,0 %, высокими – 10,0-14,0 %. По параметру «частота регенерации зеленых растений» низкими считали значения от 0 до 2,0 %, средними – от 3,0 до 7,0 %, высокими – от 8,0 до 12,0 %. По параметру «частота регенерации альбиносных растений» низкими считали значения от 0 до 10 %, средними – от 11,0 до 25,0 %, высокими – от 26,0 до 50,0 %

Для получения гибридов  $F_1$  и  $F_2$  растения тритикале выращивали в полевых условиях. Посев осуществляли в пяти повторностях. Для скрещивания брали по 15 растений. Скрещивание проводилось путем ограниченно свободного опыления, были проведены прямые и обратные скрещивания между генотипами тритикале, контрастными по различным параметрам андрогенеза *in vitro*

Выделение геномной ДНК проводили из зерновок стандартным фенольно-хлороформным методом [8]. Анализ качества и количества выделенной ДНК проверяли в 1 %-ном агарозном геле и на спектрофотометре «Ultrospec 3300pro» (Amersham Biosciences).

Для анализа межлинейного полиморфизма были выбраны 32 микросателлитных локуса, находящихся на хромосомах 2А (*Xbarc5*, *Xgwm339*, *Xgwm312*, *Xgwm294*, *Xbarc309*, *Xgwm445*, *Xgwm359*, *Xgwm95*); 2В (*Xgwm388*, *Xbarc13*, *Xbarc167*, *Xbarc200*, *Xbarc318*, *Xbarc349*); 5А (*Xgwm304*, *Xgwm415*, *Xgwm154*, *Xgwm205*, *Xgwm293*, *Xgwm156*, *Xgwm595*, *Xgwm186*, *Xgwm126*, *Xgwm291*) и 5В (*Xgwm234*, *Xgwm443*, *Xgwm540*, *Xgwm 499*, *Xgwm 335*, *Xgwm67*, *Xgwm554*, *Xgwm406*). Последовательности праймеров подбирали с использованием базы данных GrainGenes [9]. ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем из расчета на одну реакцию:  $MgCl_2$  – 2 мМ, прямого и обратного праймеров (один из праймеров нес флуоресцентную метку) к одному из маркеров – по 0,1 пМ, дНТФ – 80 мкМ, 1 единицу *Taq* полимеразы в инкубационном буфере, деонизированную стерильную воду – 13,7 мкл. Концентрация геномной ДНК составляла 100 нг на 25 мкл. Программа амплификации: 94° С – 3 мин; (94° С – 1 мин.,  $T_{отжига}^{\circ}C$  – 2 мин., 72° С – 2 мин.) – 40 циклов; 72° С – 10 мин. Температуру отжига выбирали в зависимости от последовательности праймера [9].

Размеры полученных продуктов амплификации определяли методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программы GeneMapper v.5.0. Для расчета коэффициента Пирсона использовали MS Excel.

С целью поиска контрастных по отзывчивости форм в культуру пыльников *in vitro* были введены 24 генотипа тритикале: 5 озимых сортов, 1 сортообразец, 4 яровых линии удвоенных гаплоидов и 15 яровых гибридов. Все исследованные генотипы проявили способность к индукции новообразований и регенерации растений. Вариабельность по способности к новообразованию составила от 7,0 эмбриоидов на 100 пыльников у гибрида №295 Э-2579 × СНД 492/02 Э-2266 до 57,8 эмбриоидов на 100 пыльников у гибрида Легінь харьковский × Рубин соответственно. Среднее значение по данному параметру составило 23,3%.

Важным признаком, определяющим эффективность практического использования метода культуры пыльников *in vitro*, является выход растений-регенерантов. Способность к регенерации растений варьировала от 0,5% у гибрида (Ясь × Ванад) × Узор, до 22,1% у удвоенного гаплоида DH-27-1-08-1. Среднее значение параметра «выход растений-регенерантов» было 4,8 растений на 100 инокулированных пыльников. Средние значения по частоте формирования отдельно зеленых и альбиносных растений составили 9,1 и 14,5% растений-регенерантов, соответственно, при этом доля зеленых растений составила от 1,7% у линии DH-3-1-09 до 89,1% у линии DH-27-1-08-1. Среднее значение по данному параметру – 37,4%.

В результате скрининга коллекции из 24 форм тритикале, имевших различный эмбриогенный потенциал, для создания гибридов F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> нами были отобраны четыре линии удвоенных гаплоидов, созданные ранее методом культуры пыльников в лаборатории генетической и клеточной инженерии Института генетики и цитологии НАН Беларуси: DH-3-1-09, DH-11-2-09, DH-12-1-09, DH-27-1-08-1, являвшиеся наиболее контрастными по параметрам андрогенеза, связанным с регенерацией *in vitro*: «выход растений-регенерантов»,

«частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений». (таблица 1).

Таблица 1. – Параметры андрогенеза *in vitro* у линий удвоенных гаплоидов тритикале, контрастных по отзывчивости в культуре пыльников

Генотип	Выход эмбриоидов, %	Выход раст.-регенерантов, %	Частота регенерации зеленых растений	Частота регенерации альбиносных	Доля зеленых растений
Dh-3-1-09	26,3	6,0	1,0	18,9	1,7
Dh-11-2-09	41,1	15,3	4,1	31,3	11,7
Dh-12-1-09	28,7	9,1	26,2	3,8	87,5
Dh-27-1-08-1	49,4	22,1	38,0	4,7	89,1

Удвоенный гаплоид DH-3-1-09 характеризовался низким выходом растений-регенерантов, высокой частотой формирования альбиносных и низкой – зеленых растений-регенерантов; удвоенный гаплоид DH-11-2-09 отличался высоким выходом растений-регенерантов, с преобладанием альбиносных форм. Удвоенный гаплоид DH-12-1-09 характеризовался низким выходом растений-регенерантов, с преобладанием зеленых форм; удвоенный гаплоид DH-27-1-08-1 характеризовался высоким выходом растений-регенерантов, а также высокой частотой формирования зеленых растений-регенерантов.

На основании данных генотипов было создано 4 популяции гибридных растений F<sub>2</sub>. В каждой популяции было отобрано и оценено по каждому параметру (выход эмбриоидов, общий выход растений-регенерантов, частота регенерации зеленых и альбиносных растений) по 48 индивидуальных растений, после чего они были отнесены к одной из трех групп, характеризующихся высоким, средним или низким значением определенного параметра.

Анализ полученных данных показал значительный разброс значений по параметрам андрогенеза *in vitro* для индивидуальных растений в пределах каждой изученной популяции F<sub>2</sub>. В частности, значение параметра «выход эмбриоидов» варьировало от 0 до 98,8 %, параметр «выход растений-регенерантов» от 0 до 12,5 %, параметры «частота регенерации зеленых растений» и «частота регенерации альбиносных растений» – от 0 до 50,0 %. При этом по трем из четырех исследованных параметров андрогенеза *in vitro* («выход растений-регенерантов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений») абсолютное большинство растений во всех четырех популяциях попало в группу низких значений.

На последующем этапе определяли наличие полиморфизма по микросателлитным локусам, расположенным на тех хромосомах, для которых показана связь со способностью к андрогенезу и регенерации растений у родительских генотипов тритикале. Были изучены 32 микросателлитных локуса: 8 локусов для хромосомы 2А, 6 локусов для хромосомы 2В, 10 локусов для хромосомы 5А и 8 локусов для хромосомы 5В. Нами обнаружен межлинейный полиморфизм по 5 из 32 исследованных микросателлитных локусов у родительских линий удвоенных гаплоидов тритикале: локус *Xgwm312* (хромосома 2А); *Xbarc 318* (хромосома 2В); *Xgwm291*, *Xgwm156* (хромосома 5А); *Xgwm540* (хромосома 5В). Для 5 SSR локусов было выявлено в общей сложности 11 различных фрагментов (таблица 2).

Таблица 2. – Размер фрагментов полиморфных микросателлитных локусов у контрастных по способности к андрогенезу *in vitro* генотипов тритикале

Генотип	Полиморфизм микросателлитных локусов, п.н.				
	<i>Xgwm312</i>	<i>Xbarc318</i>	<i>Xgwm291</i>	<i>Xgwm156</i>	<i>Xgwm540</i>
DH-3-1-09	195	290	146	290	121
DH-11-2-09	195	290	170	287	132
DH-12-1-09	195	260	170	287	121
DH-27-1-08-1	195, 219	290	146	310	121

При анализе расщепления по аллельному состоянию микросателлитных локусов у индивидуальных растений из популяций F<sub>2</sub> тритикале, проанализированных нами по параметрам андрогенеза *in vitro*, была оценена частота встречаемости фрагмента определенной длины для каждого локуса в каждой популяции. Различия в размерах амплифицируемых фрагментов учитывались как различные аллельные состояния соответствующего локуса.

По локусу *Xgwm291* ни в одной из гибридных популяций F<sub>2</sub> расщепления обнаружено не было, так как родительские генотипы в каждой комбинации скрещиваний несли одинаковые аллели: генотипы DH-3-1-09 и DH-27-1-08-1 – фрагмент размером 146 п.н., генотипы DH-11-2-09 и DH-12-1-09 – фрагмент размером 170 п.н. (таблица 3). По той же причине не выявлялся полиморфизм по локусам *Xgwm156* и *Xgwm312* в популяциях DH-11-2-09 × DH-12-1-09 и DH-12-1-09 × DH-11-2-09, а также по локусам *Xgwm540* и *Xbarc318* в популяциях DH-3-1-09 × DH-27-1-08-1 и DH-27-1-08-1 × DH-3-1-09.

Для выявления степени корреляции между аллельным состоянием микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro* были рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона (r-Пирсона) для тех популяций, в которых наблюдалось расщепление по аллельному состоянию исследуемых SSR локусов (таблица 3).

Таблица 3. – Коэффициенты корреляции Пирсона между аллельным состоянием микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro* у гексаплоидного тритикале

Гибридная популяция	Выход эмбриоидов, %	Выход регенерантов, %	Частота егенерации зеленых растений	Частота регенерации альбиносных растений
<i>Xgwm312</i>				
DH-3-1-09 × DH-27-1-08-1	0,92**	0,74	0,70	0,69
DH-27-1-08-1 × DH-3-1-09	0,92**	0,74	0,70	0,69
<i>Xbarc318</i>				
DH-11-2-09 × DH-12-1-09	0,93**	0,88*	0,85*	0,81*
DH-12-1-09 × DH-11-2-09	0,93**	0,99***	0,99***	0,98***
<i>Xgwm156</i>				
DH-3-1-09 × DH-27-1-08-1	0,97***	0,80	0,76	0,75
DH-27-1-08-1 × DH-3-1-09	0,94**	0,79	0,77	0,78
<i>Xgwm540</i>				
DH-11-2-09 × DH-12-1-09	0,80	0,98***	0,96**	0,94**
DH-12-1-09 × DH-11-2-09	0,97***	0,97***	0,96**	0,96**

Примечание –\* – достоверно при P≤0,05; \*\* – достоверно при P≤0,01; \*\*\*–достоверно при P≤0,001.

Полученные в ходе исследования данные показали наличие корреляции между аллелями 4 полиморфных SSR локусов и отзывчивостью в культуре пыльников *in vitro*. Так, для локуса *Xgwm312* выявлена корреляция между высокими значениями параметров «выход эмбриоидов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений» и «выход растений-регенерантов» и наличием аллеля 219 п.н. при отсутствии аллеля 195 п.н. Наличие только аллеля 195 п.н. коррелировало со средними значениями исследуемых параметров, а наличие обоих аллелей – с их низкими значениями. Для локуса *Xbarc318* одновременное наличие аллелей 260 п.н. и 290 п.н. коррелировало с низкими значениями исследуемых параметров андрогенеза *in vitro*, наличие только аллеля 290 п.н. в большей степени коррелировало со средними значениями, только аллеля 260 п.н. – с высокими значениями всех исследуемых параметров андрогенеза *in vitro*. Для локуса *Xgwm156* наблюдалась корреляция между наличием аллелей 290 п.н. и 310 п.н. в гетерозиготном состоянии и низкими значениями всех исследуемых параметров андрогенеза *in vitro*. Наличие аллеля 290 п.н. коррелировало со средними значениями, а наличие аллеля 310 п.н. – с высокими значениями указанных параметров. Для локуса *Xgwm540* наблюдалась тесная связь между низкими значениями исследуемых параметров андрогенеза *in vitro* и одновременным наличием аллелей 121 п.н. и 132 п.н. В гомозиготном состоянии наличие аллеля 132 п.н. коррелировало со средними, а аллеля 121 п.н. – с высокими значениями параметров андрогенеза.

Таким образом, проведенное нами комплексное исследование на расщепляющихся популяциях F<sub>2</sub>, полученных от скрещивания линий удвоенных гаплоидов тритикале, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*, позволило установить корреляцию между аллельным состоянием ряда микросателлитных локусов, расположенных на хромосомах 2A, 2B, 5A, 5B и эффективностью андрогенеза в культуре пыльников *in vitro* у гексаплоидного тритикале. Наиболее тесная связь наблюдалась для локусов *Xgwm540* и *Xbarc318*. Для локусов *Xgwm156* и *Xgwm312* обнаружена высокая корреляция между наличием фрагмента размером 310 п.н. (*Xgwm156*) и 219 п.н. (*Xgwm312*) и высокими значениями параметра «выход эмбриоидов». Мы полагаем, что указанные аллели могут быть использованы в качестве маркеров для обнаружения отзывчивых генотипов и получения высокоотзывчивых сортов и линий тритикале в культуре пыльников *in vitro*, что позволит существенно повысить эффективность данной методики.

#### Список использованных источников

1. Иванов, Г.И. Биотехнологические аспекты создания исходного материала для селекции зерновых колосовых культур: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23 / Г.И. Иванов – Кр., 2006. – 276 с.
2. Гриб С.И. Генофонд, методы и результаты селекции тритикале в Беларуси // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2014. – №3. – С.40-45.
3. Makowska, K. Albinism in barley androgenesis / K. Makowska, S. Oleszczuk // Plant Cell Rep. – 2014. – Vol. 33, №3. P. 385-392.
4. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines / S. Agache [et al.] // Theor. Appl. Genet. – Vol. 77. – P. 7-11.
5. Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores // N.H. Nielsen [et al.] / Plant Breeding. – 2015. – Vol. 134, №3. – P. 255-263.
6. Tuvešson, K.D. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture / K. D. Tuvešson, S. Pedersen, S.B. Andersen // Theor. Appl. Genet. – 1989. – Vol. 78. – P.879-883.
7. Лагуновская, Е.В. Эффективность использования различных типов индукционных питательных сред при культивировании пыльников гексаплоидного тритикале. // Е.В. Лагуновская, О.И. Зайцева, В.А. Лемеш // Факторы экспериментальной эволюции организмов: Сб. науч. трудов / Национальная академия наук Украины, Институт молекулярной биологии и генетики, Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (гл. ред.) [и др.]. – К.: Укр. о-во генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова, 2019. – Т. 25. – С. 260-265.
8. Дорохов, Д.Б. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов / Д.Б. Дорохов, Э. Клоке // Генетика. – 1997. – Т. 33, № 4. – С. 443–450.
9. GrainGenes [Electronic resource]. – Mode of access: <https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/GG3/browse.cgi>. – Date of access: 03.09.2021

**РОСТ И РАЗВИТИЕ ГЛУБИННОЙ КУЛЬТУРЫ *STEREUM HIRSUTUM*:  
ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ**

Д.А. Слиж, О.Н. Жук

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, d-grushevskaya@mail.ru*

Грибы представляют собой особое царство. По наличию в обмене мочевины, хитина в оболочке клеток, запасного продукта гликогена, а не крахмала, напоминают животных. С другой стороны, по способу питания, по ряду процессов метаболизма, по неограниченному росту ведут себя как растения. Грибы синтезируют огромный спектр субстанций, обладающих самыми разнообразными свойствами: от лечебных до мощных ядов. Как ценный пищевой продукт и как лекарственный источник грибы используются с древних времен [1]. Их биологическая активность основана на синтезе вторичных метаболитов, таких как полисахариды, гликопротеины, протеогликаны, терпеноиды, жирные кислоты, белки и лектины. Многие противоопухолевые средства и иммуномодуляторы были получены из этих компонентов [2].

Для массового получения препаратов или очищенных биологически активных веществ из грибов предпочтительно биотехнологическое производство. Помимо круглогодичности и бережливого отношения к природе, питательная среда в ферментере легко контролируется и ее состав может быть обогащен в строго дозируемых количествах биологически активными веществами, в том числе и теми, которые могут быть рассмотрены как факторы роста. В этом ракурсе большой и оправданный интерес представляют brassinosterоиды (БС) – широко распространенные в растительном мире фитогормоны класса стероидов. Их регуляторная роль проявляется в растениях в стимуляции процессов роста, интенсивности фотосинтеза, изменении белкового метаболизма и многих других сторон обмена веществ [3]. О роли brassinosterоидов в физиолого-биохимических процессах грибов сведения ограничены, практически нет данных о влиянии разных классов БС на метаболизм грибов, разработка данного направления важна как в фундаментальном аспекте, так и в чисто практическом приложении.

**Целью настоящего исследования** было установление характера воздействия БС представителей ряда brassinosterоидов и ряда кастастероидов на рост и развитие базидиальных грибов в поверхностной и глубинной культуре.

**Материалы и методы.** Штамм *Stereum hirsutum* был выделен нами и включен в реестр коллекции штаммов грибов ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» под номером 492. Исследуемые образцы brassinosterоидов были синтезированы в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Поверхностное культивирование проводили на агаризованной картофельно-сахарозной среде (КСА), с добавлением 24-эпибрассинолида (24-ЭБ) и 28-гомобрассинолида (28-ГБ) в концентрации  $10^{-7}$  М, 24-эпикастастерона (24-ЭК) и 28-гомокастастерона (28-ГК) в концентрациях  $10^{-7}$  М,  $10^{-9}$  М и  $10^{-12}$  М. Для получения глубинной культуры использовали фрагменты поверхностной культуры мицелия площадью  $1 \text{ см}^2$  на 100 мл питательной картофельно-сахарозной среды (КСС), с добавлением БС в указанных выше концентрациях. Культивировали на шейкере WiseShake SHO при 70 об/мин, 24 °С, в течение 14 суток. Далее мицелий фильтровали, высушивали при 36 °С до постоянной массы.

Все эксперименты проведены в трех повторах.

**Результаты и их обсуждение.**

**Поверхностное культивирование.** При поверхностном культивировании на плотной питательной среде КСА, первые признаки роста у *S. hirsutum* наблюдались на 3 сутки во всех сериях эксперимента. Ростстимулирующей активности исследуемых БС по отношению к *S. hirsutum* при поверхностном культивировании не выявлено.

**Глубинное культивирование.** Мицелий *S. hirsutum* во всех вариантах эксперимента формировался в виде студенистого образования, клубочков и тяжей. Клубочки и тяжи были плотные, гладкие и неопушенные (рисунки 1 и 2).

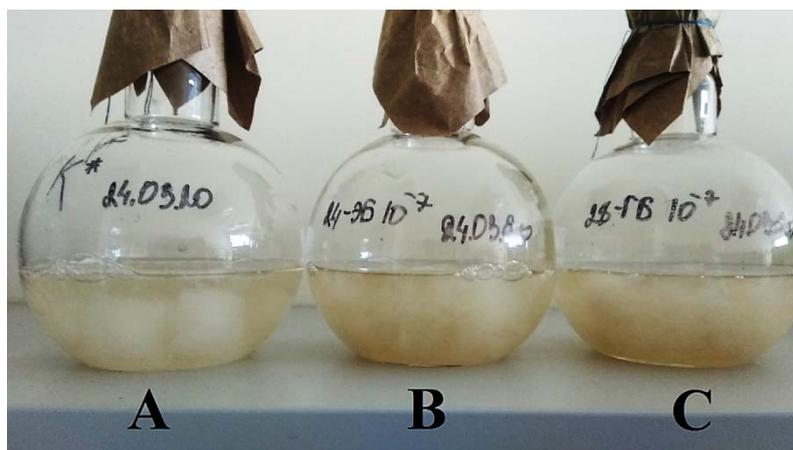


Рисунок 1. – Рост мицелия *S. hirsutum* на 14 сутки глубинного культивирования (А – контроль, В – с добавлением 24-ЭБ  $10^{-7}$ , С – с добавлением 28-ГБ  $10^{-7}$ )

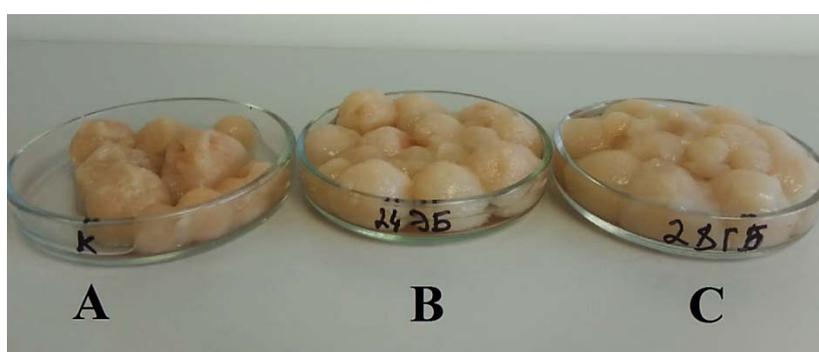


Рисунок 2. – Мицелий *S. hirsutum* на 14 сутки глубинного культивирования (А – контроль, В – с добавлением 24-ЭБ  $10^{-7}$ , С – с добавлением 28-ГБ  $10^{-7}$ )

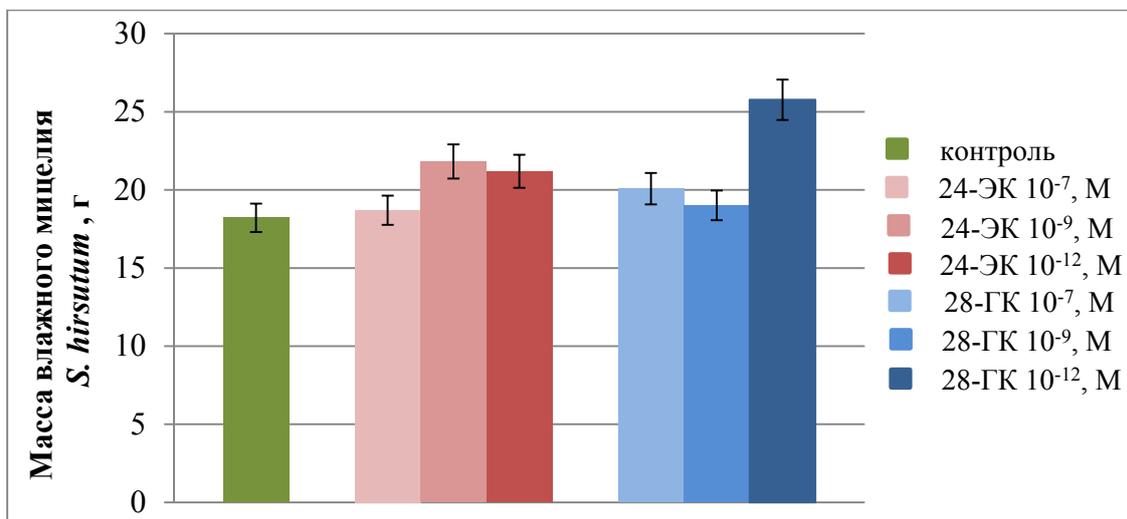
Степень влияния 24-ЭБ и 28-ГБ в концентрации  $10^{-7}$  М на накопление биомассы *S. hirsutum* при глубинном культивировании в течение 14 суток анализировалась по массе влажного и сухого мицелия (таблица).

Таблица – Влияние 24-ЭБ  $10^{-7}$  и 28-ГБ  $10^{-7}$  на нарастание биомассы мицелия *S. hirsutum* на 14 сутки глубинного культивирования

	Влажная масса, г	Сухая масса, г
контроль	18,02±1,27	0,49±0,23
24-ЭБ $10^{-7}$ М	33,36±1,45	0,95±0,10
28-ГБ $10^{-7}$ М	46,94±0,96	1,10±0,11

Как следует из таблицы, добавление 24-ЭБ и 28-ГБ стимулирует нарастание биомассы мицелия. Показатели по влажной массе опытных колб превысили показатели колб контроля: добавление 24-ЭБ – в 1,85 раза, добавление 28-ГБ – в 2,6 раза. Аналогичная ситуация и по показателям сухой массы: добавление 24-ЭБ – в 1,9 раза, добавление 28-ГБ – в 2,3 раза. Следовательно, добавление БС ряда брассинолидов стимулирует рост и накопление биомассы *S. hirsutum*.

Что касается чувствительности *S. hirsutum* к БС ряда кастастеронов, то в аналогичных условиях культивирования результаты нами получены несколько иные (рисунок 3).



**Рисунок 3. – Влияние 24-ЭЖ и 28-ГК на нарастание влажной биомассы мицелия *S. hirsutum* (14 сутки глубинного культивирования)**

В этой серии экспериментов к 14 суткам масса влажного мицелия *S. hirsutum*, составила  $18,21 \pm 1,82$  г, при введении в питательную среду БС ряда кастастеронов масса мицелия также превышала показатели контроля, на это превышение не было таким выраженным, как у БС ряда брассинолидов. Наибольшее нарастание влажной массы мицелия индуцировалось внесением 28-ГК  $10^{-12}$  М – она за период культивирования в течение 14 суток достигла значений  $25,77 \pm 1,47$  г, что на 14% превышает значения контроля. Эти результаты свидетельствуют о меньшей степени влияния на *S. hirsutum* кастастеронов по сравнению с брассинолидами в условиях наших экспериментов.

Таким образом, в глубинной культуре дереворазрушающий гриб *S. hirsutum* отзывчив на введение БС, при этом степень влияния зависит как от их класса, так и от концентрации в среде культивирования. Стимуляция нарастания массы мицелия БС может служить основанием для введения этих соединений в питательные среды в качестве факторов роста.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганометрия» на 2021-2025 годы (подпрограмма «Химические основы процессов жизнедеятельности») (Биоорганометрия), задание 2.3.3.4).*

#### Список использованных источников

1. Cheung, P. C. K. The nutritional and health benefits of mushrooms / P. C. K. Cheung // Nutrition Bulletin. – Volume 35, Issue 4, 2010. – P. 292-299.
2. Moradali, M. F. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) / M.F. Moradal, H. Mostafavi, S. Ghods, G.A. Hedjaroude//International Immunopharmacology. – Volume 7, Issue 6, 2007. – P. 701-724.
3. Zhabinskii, V.N. Steroid plant hormones: effects outside plant kingdom / Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A. // Steroids. – Volume 97, 2015. – P. 87-97.

УДК 582.287.238:577.29

### АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ШАМПИНЬОНА ДВУСПОРОВОГО

**К.С. Страпко, Д.А. Слиж, О.Н. Жук**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, ksenia\_strapkoh@mail.ru*

Существование живых клеток в среде богатой свободными радикалами было бы невозможным при отсутствии антиоксидантов – веществ, способных ингибировать их активность и накопление. Антиоксидантной способностью могут обладать субстанции различной природы и строения – некоторые группы ферментов, витаминов, а также простые вещества (например, селен). Источниками антиоксидантов для человека являются ряд молекул, синтезируемых собственными клетками

(супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион и др.) и антиоксиданты, содержащиеся в пище, например, некоторые витамины, растительные пигменты флавоноиды. Поиск природных источников антиоксидантов, в том числе устойчивых к влиянию термической обработки, является перспективным направлением биотехнологии.

Базидиальные грибы имеют высокую пищевую значимость, известны как источники ценных биологически активных веществ разного генезиса, в том числе макро- и микроэлементов. Они богаты белками и органическими кислотами. В них содержатся ферменты, способствующие расщеплению жиров, клетчатки, гликогена, витамины С, никотиновая кислота, витамины группы В, группы Р, а в некоторых – каротин и витамин D. Что касается минеральных веществ, то их общее количество может достигать до 7-8% сухой массы – железо, цинк, марганец, медь, никель, кобальт, хром, йод, молибден, фосфор, натрий и кальций [1]. Высокая антиоксидантная активность показана для экстрактов из плодовых тел многих видов дикорастущих и культивируемых съедобных и лекарственных грибов. Такая активность грибов связана с присутствием в их составе хорошо известных антиоксидантов – витаминов С и Е, микроэлементов селен и цинк, *Agaricus bisporus* помимо этого содержит в своем составе эргоферин и глутатион [2,3]. В силу того, что базидиальные грибы обладают высокой скоростью роста и большим выходом биомассы, они рассматриваются как природный источник антиоксидантов.

Поскольку питание человека в значительной мере состоит из потребления пищи, приготовленной с использованием высоких температур, то при такой обработке антиоксидантная способность многих исходных продуктов значительно снижается. При 100 °С падает активность основных антиоксидантов – до 50% активности теряет витамин С, не менее 30% теряется активность пероксидазы картофеля [4], практически исчезает активность флавоноидов группы витамина Р.

Целью нашей работы явилось изучение антиоксидантного статуса базидиальных грибов на примере *Agaricus bisporus* и зависимость его от температуры.

**Материалы и методы исследований.** Объектом исследования явился базидиальный гриб шампиньон двуспоровый (*Agaricus bisporus*), в качестве контроля использован картофель (*Solanum tuberosum*) – известный источник антиоксидантных субстанций.

Для проведения эксперимента были приготовлены экстракты из плодового тела *Agaricus bisporus* и клубня *Solanum tuberosum* в 0,09% растворе NaCl в сыром виде и после пятиминутного кипячения.

Антиоксидантную активность определяли в реакции аутоокисления адреналина гидрохлорида *in vitro* спектрофотометрическим методом в течение 90 секунд, при длине волны 347 нм, в кювете толщиной 10 мм. В стеклянную кювету добавляли 2 мл 0,2М натрий-карбонатного буфера (рН=10,65), затем 0,06 мл исследуемого экстракта и 0,2 мл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида и измеряли оптическую плотность.

Контролем служил 0,2М натрий-карбонатный буфер (рН=10,65), к 2 мл которого добавляли 0,2 мл 0,1% раствора адреналина гидрохлорида; оптическую плотность измеряли при той же длине волны и времени, что и у образцов с экстрактом.

Антиоксидантную активность (АА) рассчитывали по формуле и выражали в процентах:

$$AA = (A_{\text{контр}} - A_x) / A_{\text{контр}} \times 100\%$$

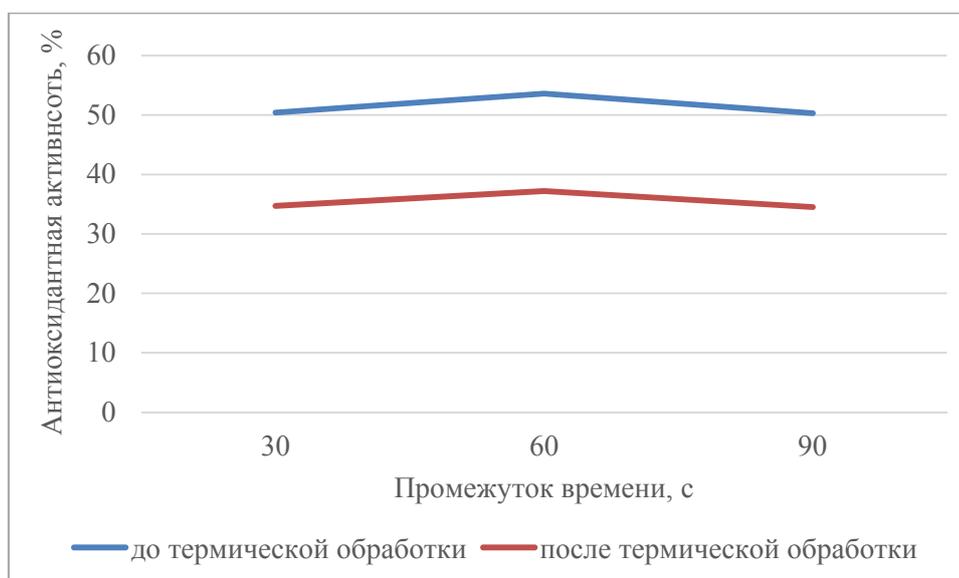
АА – антиоксидантная активность;

Аконтр – значение оптической плотности контрольной пробы;

Ах – значение оптической плотности исследуемого раствора.

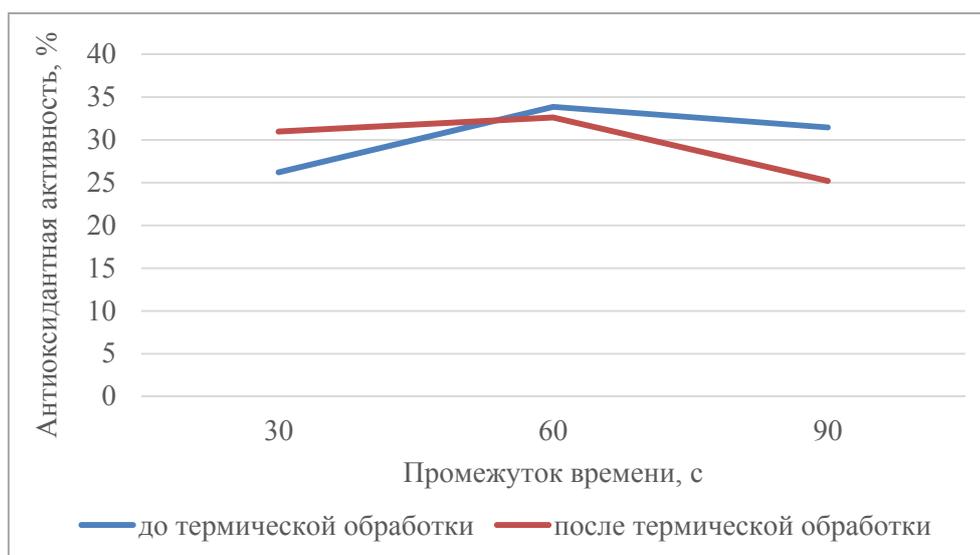
**Результаты их обсуждения.**

**Антиоксидантная активность *Solanum tuberosum*.** В образцах сырого *Solanum tuberosum* на 30-й секунде АА составила 50,4%, на 60-й – 53,6%, на 90-й – 50,2%. После термической обработки кипячением исследуемая активность значительно снизилась и составила на 30-й секунде 34,7%, на 60-й – 37,2%, на 90-й – 34,5% (рисунок 1).



**Рисунок 1. – Изменение антиоксидантной активности у экстрактов клубней *Solanum tuberosum***

**Изменение антиоксидантной активности *Agaricus bisporus*.** В образцах *Agaricus bisporus* на 30-й секунде АА составила 26,2%, на 60-й – 33,8%, на 90-й – 31,5%. После термической обработки кипячением исследуемая активность на 30-й секунде была выше до обработки и составила 30,9%, на 60-й и на 90-й была ниже и составила – 32,6% и 25,2% соответственно (рисунок 2).



**Рисунок 2. – Изменение антиоксидантной активности у экстрактов плодового тела *Agaricus bisporus***

**Сравнительный анализ антиоксидантной активности *Solanum tuberosum* и *Agaricus bisporus*.**

При сравнении изменения АА у образцов до термической обработки и после, было выявлено, что значения АА у образца *Solanum tuberosum* резко уменьшаются после термической обработки, в отличие от плодового тела *Agaricus bisporus*, у которого показатели АА после пятиминутного кипячения оставались стабильными (таблица).

Таблица – Разница значений АА до и после термической обработки у экстрактов клубней *Solanum tuberosum* и экстрактов плодового тела *Agaricus bisporus*

№	Промежуток времени, с	Разница АА у образцов до и после термической обработки, %	
		<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
1	30	15,73*	4,79
2	60	16,34*	1,22
3	90	15,76*	6,25
Среднее значение	-	15,94*	4,09

Примечание – \*данные статистически достоверны при  $P \leq 0,05$

Показатели антиоксидантной активности у базидиального гриба *Agaricus bisporus* несущественно изменили свои значения на протяжении всего эксперимента, чего не наблюдалось у образцов *Solanum tuberosum*, которые имели первоначально самые высокие показатели, но после термической обработки их АА уменьшилась.

Таким образом, и *Solanum tuberosum*, и *Agaricus bisporus* имеют в своем составе субстанции, обладающие антиоксидантной активностью. Эти субстанции, скорее всего, имеют различное химическое строение, поскольку устойчивость к повышению температуры у них статистически значимо отличается – грибы оказались более устойчивыми. Следовательно, и вещества, обеспечивающие антиоксидантную защиту у картофеля и у грибов, разные. Допустимо предположить, что у грибов эти соединения могут носить белковую природу. Необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия» на 2021-2025 годы (подпрограмма «Химические основы процессов жизнедеятельности» (Биоорхимия), задание 2.3.3.4).*

#### Список использованных источников

1. Билянова, А. С. Разработка технологии и товароведная оценка биологической активной добавки к пище на основе высшего базидиального гриба: дис. уч. степ. канд. техн. наук (05.18.15) / Анастасия Сергеевна Билялова; ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств». – Москва, 2014. – 185 с.
2. Библиотека о грибах // Химический состав и пищевая ценность грибов [Электронный ресурс]. – 2001-2019. – Режим доступа: <http://gribochek.su/>. – Дата доступа: 18.04.2021.
3. BMC Microbiology // Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of *Alternaria brassicicola* [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/>. – Дата доступа: 18.04.2021.
4. Перфильева, А.И. Влияние термической и химической обработки на картофель, выращенный в полевых условиях / Перфильева А.И., Рымарева Е.В. // Биотехнология растительного сырья, качество и безопасность продуктов питания: Материалы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 80-летию ИрГТУ. – Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2010. – С. 11-16.

УДК 581.1

#### СЕДИМЕНТАЦИЯ АМИЛОПЛАСТОВ В КЛЕТКАХ ЧЕРЕШКОВ ВЕРХУШЕЧНЫХ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГРАВИСТИМУЛЯЦИИ

**С.В. Суховеева, Е.М. Кабачевская, И.Д. Волотовский**

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск*

Гравитропизм – способность органов растения к пространственной ориентации в направлении по отношению к вектору гравитационного поля Земли.

Понимание молекулярных и физиологических механизмов формирования гравитропического ответа растений является одной из ключевых проблем современной биологии.

Выделяют три основных этапа формирования гравитропического ответа: восприятие гравитационного сигнала, трансдукция сигнала, развитие ассиметричного ростового ответа, который вызывает изгиб органа растения и, в конечном итоге, восстановление его пространственной ориентации.

В ходе первичного этапа развития гравитропического ответа физический гравитационный стимул воспринимается внутриклеточными частицами статолитами, роль которых обычно выполняют амилопласты – непигментированные пластиды, содержащие два или несколько крупных крахмальных зерен. В побегах статолиты чаще всего локализируются в особых клетках статоцитах, формирующих обкладку сосудистых пучков и окружающих сосудистые ткани по всей длине стебля, в то время как в корнях они локализованы в корневом чехлике. При этом статоциты ведут себя как датчики наклона и начальным гравитационным стимулом выступает изменение положения статолитов внутри статоцитов [1]. При перемещении (седиментации) статолитов под действием силы тяжести в нижнюю часть статоцита запускается процесс восприятия гравитационного сигнала: давление статолитов на мембраны нижней части клетки приводит к ее механическому раздражению и инициации перераспределения потоков основного регулятора роста фитогормона ауксина. В результате ассиметричного перераспределения ауксин накапливается преимущественно на нижней стороне гравистимулированного органа. Различие его концентраций приводит к дифференциальному росту растяжением клеток растений на верхней и нижней сторонах зоны гравистимуляции растения, вследствие чего формируется гравитропический изгиб. Рост клеток растений, окруженных жесткой клеточной стенкой, возможен только при временном, обратимом расщеплении структурных элементов, обеспечивающих ее жесткость, что происходит при подкислении внутренней среды клеточной стенки и активации различных гидролаз. К числу фитогормонов, способных регулировать рост клеток растяжением могут относиться не только ауксины, действие которых достаточно подробно изучено, но также брассиностероиды (БС) и этилен.

Следует отметить, что гравитропический ответ растений в основном изучается в корнях и стеблях растений. Чувствительность листьев к гравистимуляции показана в единичных исследованиях.

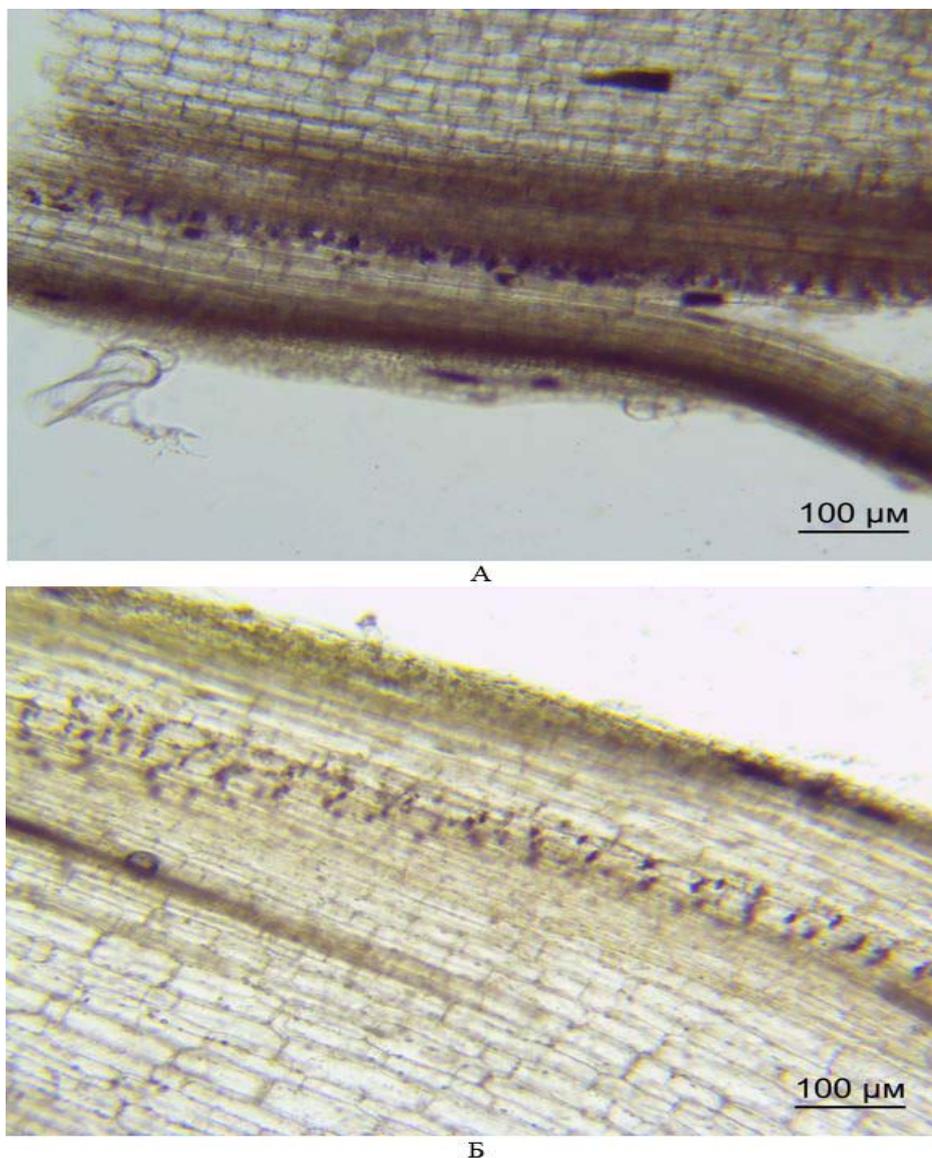
Целью данного исследования стала идентификация положения амилопластов в клетках черешков листьев томата (*Lycopersicon esculentum* L.) в различные временные интервалы после действия одиночного гравистимула, гравистимула и предшественника этилена этефона, гравистимула и синтетического брассиностероида эпина для того, чтобы оценить чувствительность листьев к гравистимулу и наличие в них реакции седиментации статолитов, аналогичное тому, что происходит в стеблях и корнях, а также возможную роль фитогормонов этилена и БС в регуляции гравитропического ответа листьев растений.

В качестве объекта исследования использовали молодые верхушечные листья 50-дневных растений томата. Растения выращивали при 16-часовом световом дне (освещение полихроматическим белым светом, 40 Вт, 150 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>) при температуре 24°C. Гравистимуляция проводилась путем поворота растений на 90° относительно гравитационного вектора Земли. Для исключения побочного эффекта условий освещенности и возможного развития дополнительной фототропической реакции после поворота растений горизонтально, гравистимуляцию проводили в темноте, предварительно поместив растения контрольных и экспериментальных групп в темноту на 24 ч для адаптации. После адаптации растения поворачивались на бок и выдерживались в горизонтальном положении в течение различных промежутков времени (от 15 мин до 24 ч). Часть опытных растений обрабатывалась (до переноса растений в темноту и гравистимуляции ~~и~~ раствором этефона (Sigma, Germany) в концентрации 100 мг/л, либо раствором (200 мкл/л) эпина (производства ИБОХ НАНБ, ОАО «Белреахим») по одному разу в день в течение 8 дней.

Отбор растительной ткани контрольных и экспериментальных групп растений, проводился на неактивном для фоторецепторов растений тусклом зеленом свету (лампа накаливания 15 Вт, стеклянный светофильтр с максимумом пропускания 470-605 нм, 0,45 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>). Верхушечные листья растений фиксировали в формалинуксусном спирте в течение 2 ч. После фиксации листья промывали в 70% этаноле и помещали в 2%-ный раствор йодида калия на 1 мин. Окрашенные черешки листьев осветляли в растворе, содержащем 5% глицерина и 50% хлоральгидрата. Анализировали полученные препараты с помощью световой электронной микроскопии.

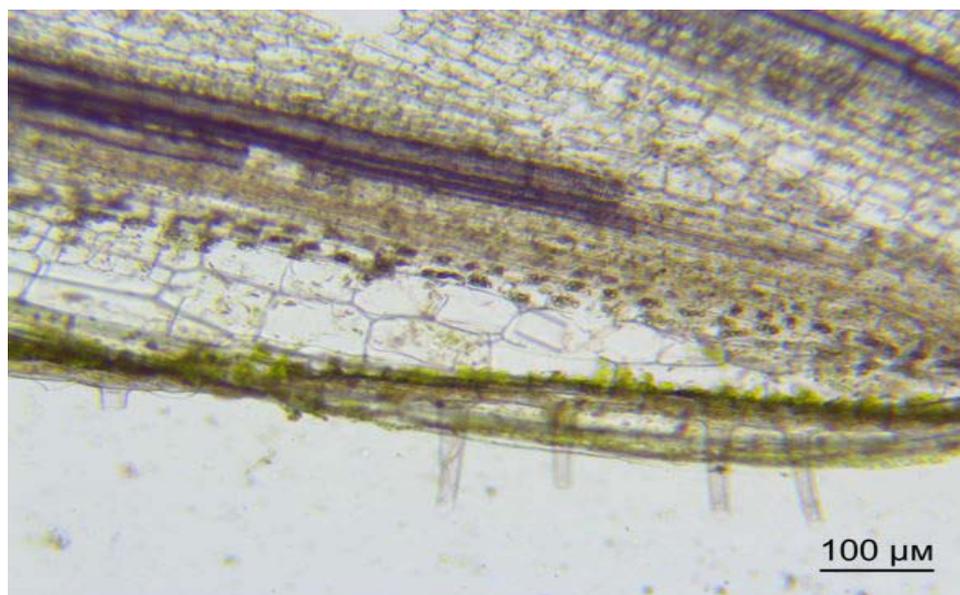
В результате микроскопических исследований срезов черешков верхушечных листьев 50-дневных растений томата нами были обнаружены группы амилопластов в нескольких слоях клеток оболочки пучка черешка листа (Рис. 1А). Осаждение амилопластов при гравистимуляции про-

исходило в соответствии с направлением силы тяжести (Рис. 1Б). Седиментация амилопластов была обнаружена в препаратах уже через 15 мин после гравистимуляции. При обработке растений эпином, как и в случае действия одной гравистимуляции, через 15 мин воздействия гравистимула, было обнаружено осаждение крахмальных зерен в сторону направления силы тяжести (Рис. 2А). Обработка источником экзогенного этилена этефоном значительно замедляла скорость седиментации амилопластов и их количество в черешках листьев по сравнению с контролем (Рис. 2Б). Первые изменения положения амилопластов при предварительной обработке этефоном обнаружены лишь через 1 час гравистимуляции, а не через 15 мин, как при других типах обработок.

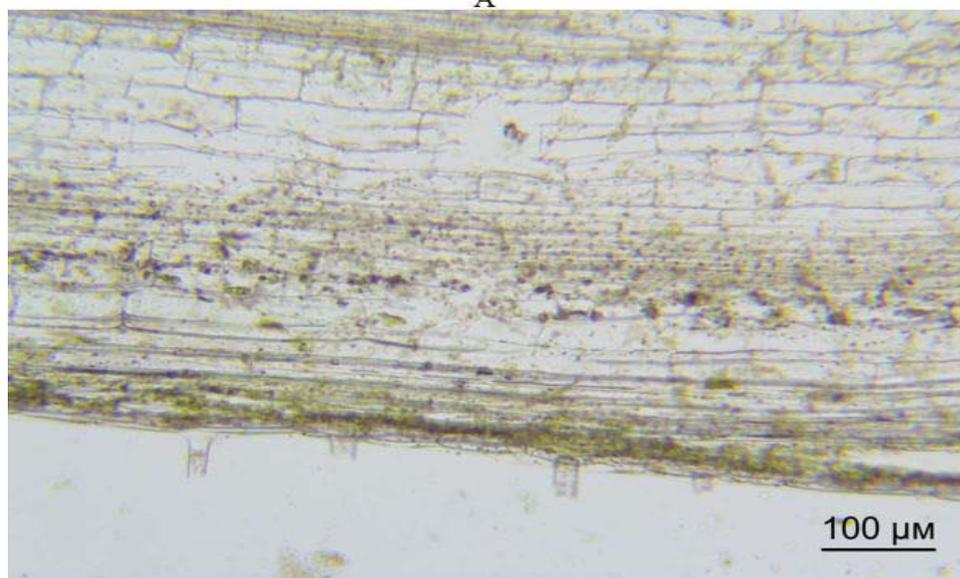


**Рисунок 1. – Амилопласты клеток черешков верхушечных листьев 50-дневных растений томата: А – в контрольной группе без гравистимуляции; Б – при переориентации растений через 15 мин гравистимуляции.**

Таким образом, проведена прямая микроскопическая демонстрация осаждения статолитов в эндодермальных клетках черешков листьев томата после гравистимуляции, также как это имеет место в стеблях и корнях растений. Следует отметить, что нами также зафиксированы движения листьев томата при действии гравистимуляции, которые происходят одновременно с формированием угла изгиба стебля и изменения уровня экспрессии многих генов, ассоциированных с транспортными, сигнальными и метаболическими процессами в клетке (данные не приведены), что согласуется с наблюдаемой седиментацией амилопластов под действием гравистимула. При этом, использованные фитогормоны, особенно этилен, довольно заметно влияли на процесс седиментации. Это обстоятельство также согласуется с тем фактом, что этилен сильно ингибировал формирование угла изгиба растений томата, а эпин его ускорял (данные не приведены).



А



Б

**Рисунок 2. – Гравитационная чувствительность амилопластов в клетках черешков верхушечных листьев 50-дневных растений томата при переориентации растений: А – при обработке эпином через 15 мин гравистимуляции; Б –при обработке этефоном через 1 ч гравистимуляции.**

Способность этилена заметно влиять на характер осаждения амилопластов при гравистимуляции может быть обусловлена влиянием этих фитогормонов на организацию цитоскелета клетки. Участие актиновых микрофиламентов цитоскелета в развитии гравитропического ответа у растений показано, например, в корнях арабидопсиса. Актиновый цитоскелет может выступать положительным регулятором гравитропизма, участвовать в поддержании везикулярного транспорта, а также может играть роль в формировании полярности клеток и распределении переносчиков ауксина в плазмалемме [2], и является неотъемлемым компонентом роста клеток растяжением [3], посредством которого развивается гравитропический изгиб органа. При изменении ориентации корней растений арабидопсиса относительно вектора силы тяжести происходит перестройка актиновых микрофиламентов в зоне растяжения – уменьшается доля аксиально ориентированных и возрастает количество наклонно и поперечно ориентированных микрофиламентов [4]. Организация актинового цитоскелета у растений при гравистимуляции может зависеть от их гормонального статуса [5, 6]. Однако механизмы взаимодействия между динамикой содержания фитогормонов и изменениями в организации цитоскелета в гравитропической реакции растений изучены недостаточно [7], поэтому с уверенностью говорить, связаны ли наблюдаемые нами различия в реакции черешков листьев томата на гравистимул без или на фоне действия этефона или эпина, с участием

цитоскелета, нельзя. Возможно, на фоне присутствия фитогормонов каким-то образом изменяется перемещение вакуоли.

Важно отметить, что наличие специализированных для восприятия гравитационного сигнала органелл амилопластов и их быстрая седиментация в ответ на гравистимул в черешках свидетельствует о важной роли верхушечных листьев в восприятии гравистимуляции растениями.

#### Список использованных источников

1. Pouliquen O. A new scenario for gravity detection in plants: the position sensor hypothesis // *Phys. Biol.* – 2017. – V. 14. – P. 035005.
2. Dhonukshe P., Tanaka H., Goh T., Ebine K., Mähönen A., Prasad K., Blilou I., Geldner N., Xu J., Uemura T., Chory J., Ueda T., Nakano A., Scheres B., Friml J. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions // *Nature* – 2008. – V. 456. P. 962–966.
3. Rahman A., Takahashi M., Shibasaki K., Wu S., Inaba T., Tsurumi S., Baskin T.I. Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells // *Plant Cell.* – 2010. – V. 22. P. 1762–1776.
4. Пожванов Г.А., Сулов Д.В., Медведев С.С. Перестройки актинового цитоскелета в ходе гравитропической реакции корней арабидопсиса // *Цитология.* – 2013 – Т. 55. – С. 28–35.
5. Nick P., Han M.-J., An G. Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments // *Plant Physiol.* – 2009. – V. 151. – P. 155–167.
6. Zhao Y., Zhao S., Mao T., Qu X., Cao W., Zhang L., Zhang W., He L., Li S., Ren S., Zhao J., Zhu G., Huang S., Ye K., Ming Y.M., et al. The plant-specific actin binding protein SCAB1 stabilizes actin filaments and regulates stomatal movement in *Arabidopsis* // *Plant Cell* – 2011. – V. 23. – P. 2314–2330.
7. Blancaflor E.B. Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton // *Am. J. Bot.* – 2013. – V. 100. – P. 143–152

УДК 663.4

### КИЛЛЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

С.А. Цапко, В.О. Красинько

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, [sophie.tsapko@gmail.com](mailto:sophie.tsapko@gmail.com)

**Вступление.** Дрожжи как микроорганизмы с высоким биотехнологическим потенциалом являются объектами различных научных исследований. Особый интерес для ученых представляют киллер-токсины дрожжей – экзометаболиты белкового происхождения с ярко выраженной антагонистической активностью против чувствительных микроорганизмов. Прежде, чем попасть в клетку чувствительного микроорганизма, киллер-токсин должен пройти два этапа связывания с рецепторами: с первичными рецепторами, которые находятся на клеточной стенке, и вторичными рецепторами, расположенными в плазматической мембране клетки. Такие первичные рецепторы, как  $\beta$ -1,3-глюкан, были обнаружены в *Williopsis saturnus* WC91-2 [1], *Tetrapisispora phaffii* DBVPG6076 [2] и *Pichia anomala* ATCC 96603 [3];  $\beta$ -1,6-глюкан – у *P. anomala* DBVPG 3003 [4], маннопротеин – у *P. membranifaciens* CUC1086 [5]; хитин – у *Debaryomyces robertsiae* CBS6693 [6]. Этап связывания киллер-токсина с первичными рецепторами не требует затрат энергии, а значит, является энергонезависимым. Следующий этап воздействия киллер-токсинов на клетку-мишень заключается во взаимодействии токсина с вторичными рецепторами на цитоплазматической мембране, образовании энергозависимого комплекса из вторичных рецепторов и киллер-токсина с последующей активацией мембранных каналов. В результате такого взаимодействия нарушается функция избирательной проницаемости клеточной мембраны для протонов и высокомолекулярных соединений, таких как АТФ, изменяется градиент заряда вокруг мембраны с последующей гибелью клетки [7].

Киллерные дрожжи являются типичными представителями аутомикрофлоры растений. В последнее десятилетие были изолированы новые виды эпифитных киллерных дрожжей из различного растительного сырья. Группой бразильских исследователей во главе с *de Lima* [8] было изолировано из тропических фруктов около 580 видов дрожжей, 29 из которых обладали киллерной активностью. Наивысшая антагонистическая активность против фитопатогенных грибов вида *Colletotrichum gloeosporioides* была обнаружена у изолятов с поверхности папайи, которые позже были идентифицированы как *Meyerozyma guilliermondii*.

Из листьев, корней и коры мангрового дерева китайскими учеными [9] был выделен новый штамм *Kluyveromyces siamensis* HN12-1, являющийся активным продуцентом киллер-токсина, который характеризуется высокой активностью против патогенных для крабов дрожжей.

Группе ученых из Аргентины и Чили [10] удалось изолировать из семян араукарии чилийской штамм *Saccharomyces eubayanus* NPCC 1302, продуцирующий киллер-токсин SeКТ с молекулярной массой 70 кДа. Данный токсин проявляет широкий спектр антагонистической активности против дрожжей-вредителей виноматериалов, а именно: *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia membranifaciens*, *Meyerozyma guilliermondii* и *Pichia manshurica*.

Еще одними потенциальными продуцентами киллер-токсинов для применения в виноделии являются дрожжи *Candida pyralidae*, выделенные *Mehlomakulu et al* [11] с поверхности ягод винограда сортов Каберне Совиньон и Шардоне. Установлено, что культура синтезирует два вида киллер-токсинов: СрКТ1 и СрКТ2 с молекулярной массой более 50 кДа. Данные киллер-токсины характеризуются высокой антагонистической активностью против вредителей виноматериалов – *Brettanomyces bruxellensis*.

Группой польских ученых во главе с *Wójcik* [12] были изолированы из разного растительного сырья (листьев деревьев и кустов, лепестков цветов, злаков) 102 вида дрожжей, 24 из которых имели киллерную активность. Наивысшую киллерную активность и широкий спектр антагонистической активности проявили изоляты из лепестков цветков вишни и калины, которые ингибировали рост *C. fluviatilis*, *C. freyschussi*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia stipitis*, *Yarrowia lipolytica*. Ярко выраженную ингибирующую активность против *C. fluviatilis*, *C. parapsilosis* и *R. pallida* имели также изоляты из колосков пшеницы и ржи.

Отдельно также следует рассмотреть и эндофитные виды киллерных дрожжей, выделенных из камеди деревьев пакистанскими учеными во главе с *Mushtaq* [13]. Установлено, что самая высокая киллерная активность характерна для дрожжей *Bullera pseudoalba* Y21 и *Pichia anomala* Y16, способных ингибировать рост чувствительных дрожжей, относящихся к родам *Candida*, *Debaryomyces*, *Mrakia*, *Pichia*, *Saitoella*, *Sporidiobolus* и *Williopsis*.

В данной статье представлены результаты исследования антагонистической активности чистых культур дрожжей, выделенных из растительного сырья, собранного на территории Черниговской и Киевской области Украины: ягод и листьев винограда сорта Черный принц, виноматериалов – сброженного виноградного сока, ферментированного березового сока.

**Материалы и методы.** Выделение чистых культур дрожжей осуществляли из следующего природного сырья: ягоды YF(4), листья LF(3) и ферментированный сок винограда сорта Черный принц FCh(1), собранных в Черниговской обл. (октябрь 2020 г.), сброженный сок дикого винограда, собранного в Киевской области FK1(2), FK2(5), ферментированный березовый сок FB(6). Чистые культуры дрожжей получали путем культивирования в чашках Петри на питательной среде – сусло-агар с добавлением хлорамфеникола (0,05 г/л). Инкубацию образцов осуществляли в термостате при температуре 30 °С в течение 96 часов.

Исследование способности выделенных чистых культур дрожжей ингибировать рост других микроорганизмов осуществляли методом встречных культур на питательных средах сусло-агара и среде Сабуро при температуре 20 °С в течение 72-96 часов.

Для проведения исследований были использованы тест-культуры дрожжей из коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии и микробиологии Национального университета пищевых технологий: *Candida tropicalis*, *Candida aquatica*, *Candida lipolytica*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Candida scottii*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon cutaneum*. Поддержание тест-культур осуществляли на скошенном сусло-агара при температуре 3 °С.

Для контрольных исследований киллерной активности к наиболее чувствительным штаммам дрожжей по методу встречных культур подсевались чистые культуры выделенных дрожжей.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований была обнаружена способность чистых культур дрожжей, выделенных с растительного сырья, к подавлению роста других чувствительных видов дрожжей. Наиболее выраженный спектр антагонистической активности наблюдался для чистой культуры дрожжей, изолированной из ферментированного сока дикого винограда FK1(2), против тест-культур *R. glutinis*, *C. utilis*, *C. aquatica* и *C. tropicalis*. Культура дрожжей, выделенная из сброженного виноградного сока сорта Черный принц FCh(1), ингибировала рост дрожжей *C. aquatica*, *R. glutinis* и *C. utilis*. Слабая антагонистическая активность против дрожжей *C. utilis* была характерна для культуры дрожжей, выделенной из ягод винограда сорта Черный принц YF(4), и против *R. glutinis* у чистой культуры дрожжей, изолированной из листьев винограда сорта Черный принц LF(3). Полное отсутствие признаков подавления роста тест-

культур было характерным для дрожжей, выделенных из ферментированного березового сока FB(6).

В результате контрольных исследований киллерной активности по методу встречных культур было определено, что дрожжи *C. tropicalis* чувствительны к чистым культурам дрожжей FCh(1), FK1(2), LF(3), YF(4); дрожжи *R. glutinis* чувствительны к чистым культурам дрожжей FCh(1), LF(3), YF(4), FK2(5) и слабо чувствительны к FK1(2); *C. utilis* и *C. aquatica* слабо чувствительны к FK2(5). Следует также отметить, что для всех чистых культур дрожжей было характерным отсутствие антагонистической активности в отношении тест-культур *Trichosporon cutaneum* и *C. lipolytica*.

Наличие антагонистической активности у чистых культур, выделенных из растительного сырья, против тест-культур дрожжей свидетельствует о возможном наличии у изолятов киллерного фенотипа. В связи с этим, дальнейшие исследования будут ориентированы на подбор оптимальных условий культивирования киллерных чистых культур для интенсификации их антагонистической активности.

#### Список использованных источников

1. Wang X.X., Chi Z., Peng Y., Wang X.H., Ru S.G., Chi Z.M. Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol Res.* 2012, 167(9): 558-563. doi:10.1016/j.micres.2011.12.001.
2. Chessa R., Landolfo S., Ciani M. Biotechnological exploitation of *Tetrapisispora phaffii* killer toxin: heterologous production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017, 101(7): 1-12. doi:10.1007/s00253-016-8050-2.
3. Polonelli L., Magliani W., Ciociola T., Giovati L., Conti S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011, 99(1): 35-41. doi:10.1007/s10482-010-9496-3.
4. De Ingeniis J., Raffaelli N., Ciani M., Mannazzu I. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2010, 75(1): 1129-34.
5. Santos A., San Mauro M., Bravo E., Marquina D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiol.* 2009, 155(2): 624-634. doi:10.1099/mic.0.023663-0.6.
6. Klassen R., Kast A., Wünsche G., Paluszynski J.P., Wemhoff S., Meinhardt F. Immunity factors for two related tRNAGln targeting killer toxins distinguish cognate and non-cognate toxic subunits. *Curr Genet.* 2014, 60(3): 213-222. doi:10.1007/s00294-014-0426-1.
7. Sambuk E.V., Muzaev D.M., Rumyantsev A.M., Padkina M.V. *Saccharomyces cerevisiae* killer toxins: synthesis, mechanisms of action and practical use. *Ecological genetics.* 2019, 17(3): 59-73. doi:10.17816/ecogen17359-73.
8. de Lima J.R., Gonçalves L.R., Brandão L.R., Rosa C.A., Viana F.M. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *J Basic Microbiol.* 2013, 53(7): 590-599. doi:10.1002/jobm.201200049.
9. Buzdar M.A., Chi Z., Wang Q., Hua M.X., Chi Z.M. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 91(6): 1571-1579. doi:10.1007/s00253-011-3220-8.
10. Mazzucco, M.B., Ganga, M.A., Sangorrín, M.P. Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2019, 112(1): 965-973. doi:10.1007/s10482-019-01231-5.
11. Mehlomakulu N.N., Setati M.E., Divol B. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int J Food Microbiol.* 2014, 188: 83-91. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015.
12. Wójcik M, Kordowska-Wiater M. The occurrence of killer activity in yeasts isolated from natural habitats. *Acta Biochim Pol.* 2015, 62(4): 821-824. doi:10.18388/abp.2015\_1141.
13. Mushtaq M., Nahar S., Shahab Alam M., Shaheen G., Hashmi M.H. Screening killer activity of some yeast strains isolated from slime fluxes of trees. *Int J Biol Biotech.* 2017, 14 (1): 1-9.

# БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АКВАКУЛЬТУРЫ

УДК 664.72:543

### ОЦЕНКА ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПШЕНИЧНОЙ МУКИ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ)

**А.А. Акулович, М.М. Воробьева**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

**Введение.** Повышение качества и безопасность продуктов питания является приоритетной задачей Республики Беларусь. Важность данной проблемы определена не только условиями рыночных отношений, но и социальной значимостью, цель которой – удовлетворить население необходимыми продуктами питания высокого качества.

Переработка сельскохозяйственного сырья, закупка и поставка продуктов питания, деятельность оптовой и розничной торговли, производственный контроль пищевых продуктов, все это направлено на функционирование непрерывного технологического цикла от производства до реализации продукции конечному потребителю и обусловлено обеспечением продовольственной безопасности в Республике Беларусь.

Производство пшеничной муки, на сегодняшний день, занимает лидирующую позицию, поскольку она используется для изготовления хлебобулочных, макаронных и кондитерских изделий, а также в комбикормовой, химической, текстильной и других отраслях промышленности. Поскольку вышепредставленные продукты питания являются основными в рационе жителей нашей страны, стабильному развитию и функционированию данной отрасли уделяют огромное внимание. В связи с этим важнейшей задачей производителей является совершенствование техники и технологии, а также обеспечение высокой организации производства, позволяющее вырабатывать конкурентоспособную продукцию, отвечающую самым высоким требованиям физиологической и пищевой ценности, и противостоять на рынке непрерывно растущему потоку продовольственных товаров из-за рубежа.

В рамках настоящего исследования мы оценили качество пшеничной муки высшего и первого сорта по совокупности показателей, установленных требованиями государственных стандартов на данный вид продукции.

**Методика и метод выделения.** Исследования хлебопекарной муки проводили в 2021 году на базе производственно-технологической лаборатории ОАО «Слуцкий комбинат хлебопродуктов». Объектом исследования для определения соответствия действующим ГОСТам была выбрана линейка муки высшего сорта с маркировкой М54-28 и первого сорта с маркировкой М36-27 торговой марки «Золотой знак».

Оценку исследуемых образцов проводили по органолептическим и физико-химическим показателям. К органолептическим показателям отнесли определение цвета, запаха, хруста, а также вкуса муки. Все органолептические исследования проводились в соответствии с ГОСТ 27558-87 [1]. К физико-химическим показателям отнесли определение влажности в соответствии с ГОСТ 9404-88 [2], белизны – ГОСТ 26391-2020 [3], металло-магнитной примеси – ГОСТ 20239-74 [4], крупности – ГОСТ 27560-87 [5], клейковины – ГОСТ 27839-2013 [6], кислотности по болтушке – ГОСТ 27493-87 [7].

**Результаты исследований.** Цвет муки зависит от вида и сорта, в частности мука высшего сорта всегда светлее, а первого и второго – более темная и, кроме того, в ней присутствуют оболочечные частицы. Пшеничная мука любого сорта должна быть без посторонних запахов плесневелого, затхлого и др., а также слегка сладковатой, без кисловатого и горьковатого вкуса.

Результаты органолептических показателей, исследуемых образцов мука, представлены в таблице.

Таблица – Результаты органолептического исследования образцов муки высшего сорта с маркировкой М54-28 и первого сорта с маркировкой М36-27 торговой марки «Золотой знак»

Наименование показателей	Наименование образцов муки			
	Образец 1 Мука высшего сорта М54-28		Образец 2 Мука первого сорта М36-27	
	Нормативные значения	Фактические значения	Нормативные значения	Фактические значения
<b>Органолептические показатели</b>				
1.Цвет	Белый или белый с кремовым оттенком	Белый с кремовым оттенком	Белый или белый с желтоватым оттенком	Белый с желтоватым оттенком
2.Запах	Свойственный пшеничной муке, без посторонних запахов, не затхлый, не плесневый	Свойственный пшеничной муке, без посторонних запахов плесневелого, затхлого и др.	Свойственный пшеничной муке, без посторонних запахов, не затхлый, не плесневый	Свойственный пшеничной муке, без посторонних запахов плесневелого, затхлого и др.
3.Вкус	Свойственный пшеничной муке, без посторонних привкусов, не кислый, не горький	Слегка сладковатый, свойственный пшеничной муке, без кисловатого, горьковатого вкуса	Свойственный пшеничной муке, без посторонних привкусов, не кислый, не горький	Слегка сладковатый, свойственный пшеничной муке, без кисловатого, горьковатого вкуса

Оказалось, что образец муки высшего сорта с маркировкой М54-28 имел белый цвет с кремовым оттенком, а образец муки первого сорта с маркировкой М36-27 торговой марки – белый с желтоватым оттенком. Запах в обоих образцах свойственный пшеничной муке, а вкус – слегка сладковатый, свойственный нормальной, без кисловатого, горьковатого и других посторонних привкусов и без хруста от присутствия минеральных примесей соответствует требованиям нормативных документов. Данные органолептические показатели соответствуют ГОСТ 27558-87.

Необходимо подчеркнуть, что примеси в исследуемой массе не обнаружены.

Кроме органолептических показателей мы исследовали физико-химические показатели:

1. Содержание сырой клейковины в образце муки высшего сорта составляет 28,4%, содержание сырой клейковины в образце муки первого сорта составляет 30,3%, что соответствует ГОСТ 27839-2013.

2. При среднем показателе белизны пробы муки первого сорта на приборе РЗ-БПЛ-ЦМ 40,14 условных единиц и внесении в результаты измерений поправок на крупность – 2,0 и содержание белозерной пшеницы – 1,0 показатель белизны составил 37,14 у.ед.

При среднем показателе белизны пробы муки высшего сорта на приборе РЗ-БПЛ-ЦМ – 56,66 условные единицы и внесении в результаты измерений поправок на крупность – 2,0 и содержание белозерной пшеницы – 1,0 показатель белизны составил 53,66 у.ед, показатель второго измерения – 54,47 у.ед.

Расхождение составляет менее 1%, оба результата признали приемлемыми и в качестве окончательного результата – среднееарифметическое значение результатов двух измерений – 54,07 у. ед.

При исследовании муки первого сорта белизна составила 37,14 у. ед.

Полученные данные по белизне муки высшего и первого сорта соответствуют ГОСТ 26361-2013.

3. Частицы металломагнитной примеси размером до 2 мм не обнаружено, в том числе частицы размером от 0,5 до 2 мм, частицы металломагнитной примеси с острыми концами и краями не обнаружены также. Количество металломагнитной примеси соответствует ГОСТ 20239-74.

4. Влажность муки определяется количеством содержащейся в нем гигроскопической воды (свободной и связанной), выраженным в процентах к массе муки вместе с примесями.

Влажность муки первого сорта составила 14,2 %. Норма – до 15%.

Влажность муки высшего сорта составила 14,6%. Норма – до 15%.

В полученных результатах отклонений не выявлено. Представленные данные соответствуют ГОСТ 9404-88.

5. Кислотность муки высшего сорта составила 0,33°.

Кислотность муки первого сорта составила 0,35°.

Полученные показатели соответствуют ГОСТ27493-87 и входят в диапазон, допустимый для кислотности для муки.

**Заключение.** В ходе проведения оценки качества муки высшего и первого сорта торговой марки «Золотой знак» по совокупным показателям, нарушений требований государственных стандартов выявлено не было, что свидетельствует о безопасности данной продукции. Кроме того, мука, реализуемая на территории Республики Беларусь, характеризуется достаточно хорошими показателями качества, в частности содержанием клейковины и ее свойствами, что косвенно подтверждает хорошие хлебопекарные достоинства исследуемых образцов муки.

#### Список использованных источников

1. Мука и отруби. Методы определения цвета, запаха, вкуса и хруста: ГОСТ 27558-87 ; введ. 01.01.89. – М.: Белорус. Гос. Ин-т стандартизации и сертификации: Изд-во стандартов, 2007. – 4 с.
2. Мука и отруби. Метод определения влажности : ГОСТ 9404-88; введ. 01.01.90. – М.: Белорус. Гос. Ин-т стандартизации и сертификации: Изд-во стандартов, 2001. – 5 с.
3. Мука. Метод определения белизны: ГОСТ 26391–2020. – Взамен ГОСТ26391–2013; введ. 01.07.14. – М : Белорус. Гос. Ин-т стандартизации и сертификации, 2020. – 4 с.
4. Мука, крупа и отруби: ГОСТ 20239-74. Метод определения металло-магнитной примеси ; введ. 01.01.1976. – М.: Белорус. Гос. Ин-т стандартизации и сертификации: Изд-во стандартов, 1974. – 4 с.
5. Мука. Метод определения крупности : ГОСТ 27560-87 ; введ. 01.01.89. – М. : Белорус. Гос. Ин-т стандартизации и сертификации: Изд-во стандартов, 2007. – 4 с.
6. Пшеница и пшеничная мука. Определение содержания клейковины : ГОСТ 27839-2013 ; введ. 01.07.2014. – М : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2019. – 15 с.
7. Мука и отруби. Метод определения кислотности по болтушке : ГОСТ 27493-87; введ. 01.01.89 – М.: Белорус. Гос. Ин-т стандартизации и сертификации: Изд-во стандартов, 2007. – 4 с.

УДК 632.4 634.73 (476)

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ФУНГИЛЕКС И ФИТОСПОРИН-М ПРОТИВ АНТРАКНОЗА ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ

Н.Н. Безрученок<sup>1</sup>, С.В. Тыновец<sup>1</sup>, М.А. Макаревич<sup>2</sup>, Н.Н. Полешко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

<sup>2</sup>Брестский областной комитет природных ресурсов и охраны окружающей среды

Брест<sup>3</sup>КФХ «ФруктГолден», Столин, Беларусь

Голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum*) — вид листопадных растений из рода Вакциниум (*Vaccinium*) семейства Вересковые (*Ericaceae*). Голубика высокорослая является многолетним кустарником, высота и диаметр кроны которого достигает 2 м и больше. Плоды голубики — сочные светло-голубые, голубые или тёмно-голубые ягоды с сизым налётом, диаметром до 2,5 см, содержащие мелкие семена. По форме ягоды бывают округлые, иногда пятигранные, сплюснутые [2].

Состав ягод голубики отличается высоким содержанием витаминов С, К, Е. В умеренных количествах в плодах содержатся железо, цинк, магний, калий, фосфор и другие элементы. В состав ягод также входят пектиновые вещества, органические кислоты, клетчатка, сахара [2].

Голубику употребляют в пищу в свежем и сушёном виде без дополнительной обработки, а повреждённые ягоды перерабатывают в варенья, джемы, соки, соусы, морсы, ягодные вина, квас. В кулинарных рецептах голубика входит в состав выпечки [4]. В косметологии голубику применяют в виде экстрактов ягод, предназначенных для защиты кожи от воздействия ультрафиолетовых лучей, уменьшения покраснения и признаков старения, а также для питания кожи и обеспечения антиоксидантной поддержки [3].

Голубика в достаточном количестве содержит антоцианы – вещества, придающие ее ягодам насыщенный синий оттенок, обладающие антиоксидантной активностью, защищая здоровые клетки организма от распада. Галловая кислота, источником которой является голубика, так же обладает выраженной антиоксидантной и противовоспалительной активностью, а также противогрибковым и противовирусным действием. Ягоды голубики отличаются высоким содержанием пищевых волокон, обладающих способностью связывать и выводить из организма соли тяжелых металлов и токсины. Количество веществ, обуславливающих целебные эффекты голубики, очень сильно варьирует в зависимости от видовой и сортовой принадлежности, а также способов выращивания [2].

**Голубика** высокорослая, как и другие ягодные культуры, поражается различными болезнями. Одним из распространенных заболеваний голубики является антракноз. В настоящее время антракноз голубики высокорослой является серьезной проблемой почти во всех районах ее выращивания. Возбудитель антракноза голубики – гриб *Colletotrichum gloeosporioides*. Этот гриб может инфицировать листья, ветки, побеги, цветки и ягоды [1].

Симптомы заболевания проявляются постепенно. На листьях сначала появляются небольшие круглые или овальные коричневатые пятна с темным ободком, которые постепенно увеличиваются в размерах. Пятнистость листьев вызывают преждевременное опадение листьев и снижение способности куста к фотосинтезу, приводя к плохому закладыванию цветочных почек и возможное снижение урожая в следующем году [6,7].

На побегах болезнь проявляется сначала небольшими серо-коричневыми отметинами, которые заметно расширяются вдоль по стеблю. На молодых побегах, инфекция проявляется в виде темно-коричневых язв с концентрическими гнойными кольцами. При высокой относительной влажности воздуха на поверхности пятен появляются темные скопления спор гриба. Зараженные побеги в местах инфекции легко ломаются, молодые пораженные побеги отмирают. Инфицированные антракнозом цветки голубики высокорослой становятся светло-коричневыми, затем коричневыми или даже черными. Болезнь распространяется от инфицированных цветков к соседним веткам [5].

На ягодах болезнь обычно не проявляется до момента начала созревания ягод, но иногда она может возникнуть в период от момента цветения до начала сбора ягод. Антракноз чаще всего распространяется в конце периода цветения. После созревания плодов инфицированные участки ягод становятся несколько вмятые, вокруг них образуются характерные морщины. При очень сырой или влажной погоде конидии гриба развиваются на инфицированных областях ягод или ветвях. Зараженные ягоды окрашиваются в ярко-розовый цвет из-за большого количества спор гриба. Перезревшие ягоды особенно восприимчивы к развитию антракноза. Конидии из инфицированных ягод являются источником распространения вторичного инокулята. Особенно подвержены заболеванию молодые кусты голубики [6,7].

Варьирование в степени поражения болезнью возникает между сортами и между волнами роста. Основная часть инфекции возникает в самую раннюю волну роста, и мало или вообще не возникает в последнюю волну роста поздним летом. Пятнистость листьев основная проблема в слабомозимостойких районах с длинным продуктивным сезоном [5].

Споры возбудителя болезни зимуют на ветках, плодах и побегах, в местах их повреждений. Весной с помощью дождя и ветра споры гриба попадают на здоровые части растений. Споры гриба распространяются преимущественно во время дождей. Затянувшиеся дожди и повышенная влажность воздуха ускоряют развитие болезни. Больше всего от нее страдают загущенные кусты, где обрезка не проводилась несколько лет. В большей степени поражаются также посадки, где интенсивно вносят удобрения, особенно азотные. Плохая вентиляция, длительный застой влаги, температура воздуха выше плюс 20°C, а также недостаточно эффективная система защиты лишь ускоряют заражение. Антракноз может проявляться в течение всего вегетационного сезона, если создаются благоприятные условия для развития болезни [1].

Распространение антракноза на голубике высокорослой требует поиска новых способов защиты растений, имеющих наиболее высокую биологическую эффективность и не наносящую ущерба окружающей среде. Перспективным в этом направлении выглядит использование биоинсектицидов Фунгилекс и Фитоспорин-М.

Полевые исследования по определению биологической эффективности биологических препаратов Фунгилекс и Фитоспорин-М против антракноза голубики высокорослой проводили на промышленной плантации голубики ОАО «Полесские журавины» Пинского района Брестской области. Сорт голубики Патриот. Растения голубики выращивали в соответствии с общепринятой технологией возделывания.

Использовали общепринятые в фитопатологии методы исследований. Образцы пораженных растений подвергали микроскопированию на выявление и анализ грибных патогенов. Видовую принадлежность возбудителей болезней голубики высокорослой уточняли по определителям на основании морфологии спороношения гриба и симптомов болезней. При оценке распространенности болезни учитывали количество больных растений по отношению к общему количеству растений в повторности. Биологическую эффективность биопрепаратов определяли на 3-ий, 5-ый, 7-ой и 9-ый дни после обработки по общепринятой методике. Полученные данные обрабатывали в соответствии с общепринятыми статистическими методами.

Обработку насаждений голубики высокорослой проводили в начале распространения болезни. Рабочий раствор препарата Фунгилекс готовили в день обработки исходя из норм расхода препарата в соответствии со схемой исследований. Препарат растворяли в чистой водопроводной воде при температуре 18°C. Обработку плодоносящих насаждений голубики высокорослой проводили в сухую безветренную погоду при температуре воздуха 20°C. В контроле вносили воду без препарата. Опыт заложен в четырехкратной повторности, одна повторность – 25м<sup>2</sup>. Расход рабочей жидкости при проведении обработки препаратом Фунгилекс составил 800 л/га.

Оценку биологической эффективности препарата Фунгилекс проводили путем подсчета на учетных делянках опыта количества усыхающих побегов, на которых развивался антракноз на третьи, пятые, седьмые и девятые сутки после обработки.

Исследования по определению эффективности препарата Фунгилекс против антракноза показали, что на третьи сутки после обработки биологическая эффективность составила при норме расхода препарата 0,5 кг/га – 11,8%, 1,0 кг/га – 16,3%, 1,5 кг/га – 25,5%, 2,0 кг/га – 25,8% (таблица 1). Биологическая эффективность препарата на пятые сутки после обработки составила при норме расхода препарата 0,5 кг/га – 48,5%, 1,0 кг/га – 52,8%, 1,5 кг/га – 62,5%, 2,0 кг/га – 62,5%.

Биологическая эффективность на седьмые и девятые сутки после обработки достоверно не отличалась и составила при норме расхода препарата 0,5 кг/га 50,5% и 51,3%, 1,0 кг/га – 58,3% и 58,7%, 1,5 кг/га – 73,0% и 74,2%, 2,0 кг/га – 80,3 и 80,5%.

Полевые опыты по использованию биологического препарата Фитоспорин-М против антракноза голубики высокорослой были заложены на посадках голубики предприятия «Полесские журавинь» Пинского района Брестской области. Сорт голубики - Патриот. Растения голубики выращивали в соответствии с общепринятой технологией возделывания. Обработку насаждений голубики высокорослой проводили в начале массового распространения болезни. Рабочий раствор препарата Фитоспорин-М готовили в день обработки исходя из норм расхода препарата в соответствии со схемой исследований. Препарат растворяли в чистой водопроводной воде при температуре 18°C. Обработку плодоносящих насаждений голубики высокорослой проводили в сухую безветренную погоду при температуре воздуха 20°C. В контроле вносили воду без препарата. Опыт заложен в четырехкратной повторности, одна повторность – 25м<sup>2</sup>. Расход рабочей жидкости при проведении обработки препаратом Фитоспорин-М составил 800 л/га.

Таблица – Биологическая эффективность биофунгицида Фунгилекс против антракноза на посадках голубики высокорослой (ОАО «Полесские журавинь», Пинский район, Брестская область, 2019г.)

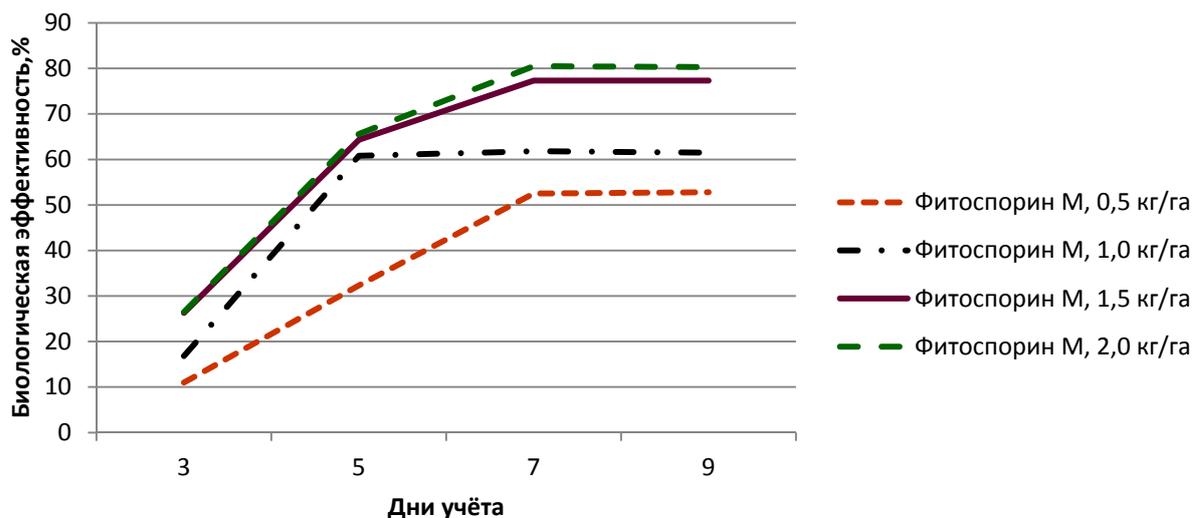
Вариант опыта	Количество усыхающих побегов по дням учёта, экз./ 25 м <sup>2</sup>				НСР <sub>05</sub>	Биологическая эффективность по дням учёта, %			
	3	5	7	9		3	5	7	9
Контроль (вода)	1,3	1,5	1,8	2,0	0,2	–	–	–	–
Фунгилекс, 0,5кг/га	1,8	6,3	6,3	6,1	0,3	11,8	48,5	50,5	51,3
Фунгилекс, 1,0кг/га	2,3	7,5	8,5	8,8	0,3	16,3	52,8	58,3	58,7
Фунгилекс, 1,5кг/га	3,5	8,0	10,8	11,03	0,4	25,5	62,5	73,0	74,2
Фунгилекс, 2,0кг/га	3,8	8,1	11,3	11,5	0,3	25,8	62,5	80,3	80,5
НСР <sub>05</sub>	0,4	0,5	0,7	0,6	–	–	–	–	–

Оценку биологической эффективности препарата Фитоспорин-М проводили путем подсчета на учетных делянках опыта количества усыхающих побегов, на которых развивался антракноз на третьи, пятые, седьмые и девятые сутки после обработки.

Исследования по определению эффективности препарата Фитоспорин-М против антракноза показали, что на третьи сутки после обработки биологическая эффективность составила при норме расхода препарата 0,5 кг/га 11,0%, 1,0 кг/га – 16,8%, 1,5 кг/га – 26,3%, 2,0 кг/га – 26,5% (рисунок 1).

Биологическая эффективность препарата на пятые сутки после обработки составила при норме расхода препарата 0,5 кг/га 32,3%, 1,0 кг/га – 60,8%, 1,5 кг/га – 64,3%, 2,0 кг/га – 65,6%.

Биологическая эффективность на седьмые и девятые сутки после обработки достоверно не отличалась и составила при норме расхода препарата 0,5 кг/га, соответственно, 52,5% и 52,8%, 1,0 кг/га – 61,8% и 61,5%, 1,5 кг/га – 77,3% и 77,5%, 2,0 кг/га – 80,5 и 80,3% (рисунок 1).



**Рисунок – Биологическая эффективность препарата Фитоспорин-М против антракноза голубики высокорослой (ОАО «Полесские журавины», Пинский район, Брестская область, 2019г).**

Таким образом, применение биофунгицидов Фунгилекс и Фитоспорин-М против антракноза голубики высокорослой оказалось достаточно эффективным, указанные биопрепараты могут быть включены в систему интегрированной защиты голубики высокорослой и использованы в органическом земледелии.

#### Список использованных источников

1. Галынская, Н. А. Патогенные грибы на производственных и коллекционных посадках клюквы, голубики и брусники в Беларуси / Н.А. Галынская, В.Г. Лягуский // Защита растений – проблемы и перспективы: Материалы международной научно-практической конференции. – Гродно, 2002. – С. 19-21.
2. Голубика – ягода XXI века / Сост. З.И. Малашевич.– Минск: Красико-Принт, 2006. – 63 с.
3. Курлович, Т.В. Голубика: многообразие видов / Т. В. Курлович [и др.]. – Минск : Красико-Принт, 2010. – 79 с.
4. Курлович, Т.В. Клюква, голубика, брусника /Т.В. Курлович. — М.: Ниола-Пресс; Издат. дом «ЮНИОН-паблик», 2007. — 200 с.
5. Плесацевич, Р. И. Болезни голубики высокорослой и обоснование приемов ее защиты / Р.И. Плесацевич, Е.Е. Берлинчик // Теоретические и прикладные аспекты рационального использования и воспроизводства недревесной продукции леса: материалы Международной научно-практической конференции (Гомель, 10-12 сентября 2008 г.). – Гомель, 2008. –С. 292-296.
6. Рекомендации по производству органических ягод в трансграничных районах Украины и Беларуси (с учетом требований стандартов ЕС): справочное пособие /Л.Е. Совик, П.М. Скрипчук, С.В. Тыновец [и др.]. – Минск: Мисанта, 2018. – 262 с.
7. Плесацевич, Р. И. Наиболее распространенные болезни в плодоносящих насаждениях голубики высокой / Р.И. Плесацевич, Е.Е. Берлинчик //Голубиководство в Беларуси: итоги и перспек-

УДК 579:637.56

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЧЕСТВА РЫБОПРОДУКТОВ

Т.В. Буйнич, Т.М. Натынчик

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

**Введение.** Беларусь хоть и не имеет выхода к морю, морскими и океаническими деликатесами жители нашей страны не обделены. Ассортимент речной, прудовой и морской рыбы в торговой сети насчитывает около 30 видов. Это то, что в продаже есть круглый год.

Для белорусов очень важно присутствие в рационе морской рыбы. Дело в том, что Беларусь не имеет статуса страны, свободной от дефицита йода. А в морской рыбе йод как раз есть.

Изменения, вызванные нехваткой йода на этапе внутриутробного развития и в раннем детском возрасте, являются необратимыми и практически не поддаются лечению и реабилитации. С дефицитом йода связано появление эндемического диффузного и узлового зоба, гипотиреоза, умственной и физической отсталости детей, кретинизма, угрозы невынашивания беременности, пороков развития у детей. В условиях йодного дефицита в сотни раз возрастает и риск радиационно-индуцированных заболеваний щитовидной железы.

Однако не стоит забывать, что в рыбе содержится комплекс витаминов и микроэлементов. Рыба – продукт, содержащий большое количество белка, и может быть прекрасной заменой животным, более тяжелым белкам. Рыба богата фосфором и необходима для укрепления костной ткани. Например, в Скандинавских странах, где употребляют значительное количество морепродуктов, заболеваемость остеопорозом меньше, чем в странах, где рыбы едят меньше [5, с. 9-13].

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, необходимо есть рыбу до четырех раз в неделю. Минимальное потребление – один раз в семь дней в количестве 100-200 граммов.

Рыбопродукты быстро изменяют свои качественные характеристики под влиянием микроорганизмов. В связи с этим важной задачей является получение рыбного сырья и рыбопродуктов с низким содержанием микроорганизмов.

Качество рыбной продукции имеет прямую зависимость от соблюдения технических режимов изготовления, качества сырья, условий реализации и хранения. Чтобы оценить микробиологическую безопасность любого пищевого продукта, необходимо установить и определить для него микробиологические нормативы (показатели). Главной особенностью микробиологических нормативов является диапазон допусков, по которым, принято определять качество продукции [1, с. 94].

В настоящее время, важен более тщательный микробиологический контроль поступающего сырья, используемого для изготовления рыбопродуктов, обеспечивающий потребителю их безвредность.

**Целью** настоящей работы явилось оценка качества готовой продукции по микробиологическим показателям.

**Методика и объекты исследований.** Исследования проведены в бактериологической лаборатории СП «Санта Бремор» ООО город Брест в 2021 году. Методы отбора и подготовку проб для выявления и определения микробиологических показателей проводили по ГОСТ 31747–2012.

Объектом исследований являлись филе сельди Атлантической слабосоленой и имитированная пищевая рыбная продукция – крабовые палочки «Русское море».

Для достижения цели был определен комплексный подход и определены следующие задачи:

1) Провести оценку микробиологических рисков по следующим показателям: количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) (ГОСТ 10444.15–94); наличие или отсутствие бактерий рода *Salmonella* (ГОСТ 31659–2012), бактерии группы кишечных палочек (БГКП) (ГОСТ 31747–2012) и количества коагулазоположительных стафилококков *Staphylococcus aureus* (ГОСТ 31746–2012).

2) Установить соответствие полученных результатов согласно требованиям ТР ЕАЭС 040/2016 «Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и

рыбной продукции» [2], ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [3] и СанПиН ГН № 52 от 21.06.2013 [4].

**Результаты и их обсуждение.** По результатам микробиологического исследования установлено, что в образцах филе сельди Атлантической слабосоленой по показателю КМАФАнМ были получены средние значения –  $1,9 \times 10^2$ , что не превышает допустимый уровень согласно ТР ЕАЭС 040/2016.

Результаты проведенных исследований на микробиологических показатели в филе сельди представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Микробиологические показатели филе сельди Атлантической слабосоленой

Показатель	Фактическое значение показателей качества				Норма, не более
	№ пробы				
	№1	№2	№3	№4	
КМАФАнМ, КОЕ/г, см <sup>3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	2×10 <sup>5</sup>
	1,9×10 <sup>3</sup>	1,7×10 <sup>3</sup>	3,1×10 <sup>3</sup>	1,1×10 <sup>3</sup>	
Среднее значение	1,9±0,05×10 <sup>2</sup>				
БГКП, г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 0,01 г				Не допускаются
Бактерии рода <i>Salmonella</i> , г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 25 г				Не допускаются
<i>Listeria monocytogenes</i> , г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 25 г				Не допускаются
Сульфитредуцирующие клостридии, г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 0,01 г				Не допускаются
<i>Staphylococcus aureus</i> , г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 1,0 г				Не допускаются

Микробиологические исследования образцов имитированной пищевой рыбной продукции – крабовые палочки «Русское море» показали, что КМАФАнМ ( $2,8 \times 10^2$  не превышал допустимый уровень значений согласно ТР ЕАЭС 040/2016 [2]. Количество энтерококков в 1,0 г составило –  $1,0 \times 10^2$ , что в пределах допустимой нормы согласно СанПиН от 21.06.2013 г. № 52 [4].

Результаты микробиологических исследований рыбной продукции – крабовые палочки «Русское море» представлены в таблице 2.

В исследованиях готовой продукции – филе сельди Атлантической и крабовые палочки «Русское море» на соответствие требованиям безопасности по микробиологическим показателям на выявление бактерий группы кишечная палочка, бактерии рода *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и сульфитредуцирующие клостридии не обнаружены.

Таблица 2. – Микробиологические показатели крабовых палочек «Русское море»

Показатель	Фактическое значение показателей качества				Норма, не более
	№ пробы				
	№1	№2	№3	№4	
КМАФАнМ, КОЕ/г, см <sup>3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	1×10 <sup>3</sup>
	3,2×10 <sup>2</sup>	3,1×10 <sup>2</sup>	2,4×10 <sup>2</sup>	2,5×10 <sup>2</sup>	
Среднее значение	2,8±0,05×10 <sup>2</sup>				
БГКП, г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 0,01 г				Не допускаются
<i>Listeria monocytogenes</i> , г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 25 г				Не допускаются
Бактерии рода <i>Salmonella</i> , г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 25 г				Не допускаются
Сульфитредуцирующие клостридии, г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 1,0 г				Не допускаются
<i>Staphylococcus aureus</i> , г/см <sup>3</sup>	Не обнаружено в 1,0 г				Не допускаются
Энтерококков в 1,0 г	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	2×10 <sup>3</sup>

**Заключение.** Установлено, что микробиологическая обсемененность исследуемой готовой рыбной продукции (крабовые палочки «Русское море», филе сельди Атлантической слабосоленой) по показателю КМАФАнМ для определенного вида готовой продукции составляло норму согласно СанПиН. Микробиологический показатель БГКП в пробах готовой рыбной продукции не был обнаружен. Результаты исследований на содержание патогенных микроорганизмов (в том числе бактерий рода *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* соответствуют требованиям предъявляемым СанПиН от 21.06.2013 г. № 52.

В ходе исследований при производстве продукции, не было замечено нарушений в технологическом процессе и температурных режимах, это свидетельствует, что рыбная продукция является безопасной для жизни потребителя.

Обобщая результаты исследований, можно сделать вывод, что исследуемая рыбная продукция СП «Санта Бремор» ООО прошла оценку контроля и качества по всем микробиологическим показателям, и тем самым установлено её соответствие нормам и требованиям Технический регламент Евразийского экономического союза “О безопасности рыбы и рыбной продукции” (ТР ЕАЭС 040/2016).

#### **Список использованных источников**

1. Агульник, М.А. Микробиология филе рыбы и рыбопродуктов / М.А. Агульник. – 2-е изд. – Минск: Энциклопедыкс, 2013. – 168 с.
2. О безопасности рыбы и рыбной продукции : ТР ЕАЭС 040/2016 : принят 24.04.2017 : вступ. В силу 01.09.2017 / Евраз. экон. комис. – Минск : Госстандарт, 2017. – 76 с.
3. О безопасности пищевой продукции : ТР ТС 021/2011 : принят 09.12.2011 : вступ. в силу 01.07.2013 / Евраз. экон. комис. – Минск : Госстандарт, 2011. – 160 с.
4. Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам. Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов : СанПиН и ГН : утв. постановлением М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 21 июня 2013 г, № 52. – Минск : [б. и.], 2013. – 430 с.
5. Спиридонов, А.А. Обогащение йодом продукции животноводства. Нормы и технологии / А.А.Спиридонов, Е.В. Мурашова, О.Ф. Кислова – Санкт-Петербург «ООО СПС–Принт», 2011. – 116 с.

УДК 577.175: 632.95.024.39

### **РЕПРОДУКТИВНАЯ СПОСОБНОСТЬ САМЦОВ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА И СПОСОБЫ ЕЕ КОРРЕКЦИИ**

**Е.М. Волкова, С.Б. Карат**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

В настоящее время наблюдается снижение воспроизводительной способности высокопродуктивных животных, одной из главных причин которого является воздействие таких стресс-факторов как нарушение условий кормления, содержания, эксплуатации и т.д. [1].

Несмотря на то, что многие аспекты влияния стресса на организм раскрыты, некоторые вопросы остаются до конца неизученными, в частности реакция организма на воздействие стресс-факторов различного генеза. Особенно это касается самцов, половая потенция и качество спермы которых отражаются на репродуктивной способности самок [2].

Доказано влияние ЭПБ-24 в отношении живых организмов. Это объясняется их структурным сходством со стероидными гормонами животных и насекомых. По последним данным исследований учёных известно, что брассиностероиды приводят к увеличению мышечной массы и физической работоспособности. Данный факт используется при производстве спортивного питания, которое уже принимают спортсмены. Повышает работоспособность, оказывает адаптогенное, иммуномодулирующее, антивирусное действие, а также положительно влияет на липидный обмен.

Предполагается антиканцерогенная и цитотоксическая активность фитогормонов, но пока не изучена на молекулярном уровне. В связи с этим, целью настоящей работы явилось определение морфофункциональных основ и разработка практических приемов коррекции длительного воздействия стресс-факторов на репродуктивную систему самцов лабораторных мышей.

**Материалы и методы исследований.** Экспериментальные исследования проводили в 2 этапа на базе лаборатории УО «Полесский государственный университет». Нами было сформировано 3 группы лабораторных мышей: Стресс, Стресс + ЭПБ, Контроль.

У животных группы «Стресс» было смоделировано состояние психоэмоционального стресса с помощью метода принудительного плавания по методу Sherwood A. У животных группы «Стресс + ЭПБ» также было смоделировано состояние психоэмоционального стресса, но при этом в воду им ежедневно добавляли ЭПБ 24. Животные третьей группы не находились под воздействием стресса, не употребляли ЭПБ 24 и являлись Контролем.

По результатам исследований сделана оценка репродуктивной способности самцов в условиях стресса и сделаны выводы о влиянии препарата 24-эпибрасинолид на структуру эритроцитов и гормонопозитивную функцию надпочечников и семенников лабораторных мышей в условиях стресса.

В результате проведенных анализов, результаты представлены как среднее арифметическое. Общий математический анализ данных производили по стандартным методам вариационной статистики, с использованием программы статистического анализа данных STATISTIKA 6.0.

Методы исследований:

1. Метод принудительного плавания по Sherwood A. был предложен с целью проверки формирования депрессивноподобного статуса у лабораторных животных. Каждую лабораторную мышь мы помещали в сосуд, заполненный водой до отметки на высоте 30 см, температура воды составляла 24–25°C (Рисунок). Лабораторные мыши опытных групп плавали 1 раз в день в течение 1 недели. Первоначально время однократного плавания составило 5 минут, каждый день оно возрастало на 1 минуту. Общий объем нагрузки составил 56 минут. Спустя 1 неделю после начала опыта животные выводились из эксперимента декапитацией с одновременным отбором проб крови для гематологического, гормонального и органов для гистологического исследований [3].



**Рисунок – Принудительное плавание**

2. Метод гуманной эвтаназии животных. Для эвтаназии могут быть использованы различные химические, фармакологические средства, не вызывающие беспокойства животных, в т.ч. использование инъекционных фармакологических препаратов, ингаляционных средств и летучих ингаляционных анестетиков.

3. Методика морфологического исследования эритроцитов и гематологических показателей крови. Гематологические показатели крови определяли на анализаторе QVC Autoread Plus.

4. Методика определения концентрации гормонов в сыворотке крови. Набор реагентов ИФА-КОРТИЗОЛ предназначен для количественного определения кортизола в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа на стрипованных полистироловых планшетах.

5. Визуальная микроскопическая оценка спермы. Оценка по густоте, вязкости, определение концентрации спермиев в сперме (подсчет спермиев в камере Горяева).

**Обсуждение результатов.** В исследованиях предполагалось, что психоэмоциональный и физический стресс будет сопровождаться отклонением от нормы гематологических показателей крови лабораторных мышей; угнетением гормонопозитивной функции (повышением концентрации кортизола); ухудшением качества спермы (снижение концентрации спермиев; двигательной активности).

В качестве способа повышающего устойчивость организма к постоянному воздействию физических стресс-факторов было испытано назначение ЭПБ-24.

В результате исследований нами было установлено, что у животных группы «Стресс», которые находились под воздействием стресса и не употребляли ЭПБ-24, наблюдаются отклонения от нормы следующих показателей: гематокрит, сегментоядерные нейтрофилы, моноциты. Также у одной из мышей была обнаружена плазматическая клетка (табл. 1).

Таблица 1. – Общий анализ крови лабораторных мышей группы «Стресс»

Показатель	Измерения	Норма
Гемоглобин, г/л	112,25 ± 0,95	111 ± 4
Гематокрит, %	<b>36 ± 1,29</b>	28 ± 2
МСНС, %	33,65 ± 0,31	33 ± 2
СОЭ, мм/ч	2	2 ± 0,1
Сегментоядерные нейтрофилы, %	<b>23 ± 3,19</b>	16 ± 1
Лимфоциты, %	63,25 ± 1,18	63 ± 2
Моноциты, %	8,25 ± 0,75	4,7 ± 0,7
Плазматическая клетка	<b>1</b>	Не содержится

У подопытных животных группы «Стресс + ЭПБ» и «Контроль» отклонений от физиологической нормы не выявлено, что подтверждает положительное влияние использования гормона ЭПБ-24 (табл. 2, 3).

Таблица 2. – Общий анализ крови лабораторных мышей группы «Стресс + ЭПБ»

Показатель	Измерения	Норма
Гемоглобин, г/л	113,25 ± 1,03	111 ± 4
Гематокрит, %	28,75 ± 0,25	28 ± 2
МСНС, %	33,70 ± 0,11	33 ± 2
СОЭ, мм/ч	2	2 ± 0,1
Сегментоядерные нейтрофилы, %	16,25 ± 0,25	16 ± 1
Лимфоциты, %	64,25 ± 0,48	63 ± 2
Моноциты, %	4,88 ± 0,06	4,7 ± 0,7
Плазматическая клетка	Не содержится	Не содержится

Результаты исследований на общий анализ крови лабораторных мышей группы «Стресс + ЭПБ» показали, что при использовании гормона ЭПБ-24 все показатели стабилизировались и находились в пределах физиологической нормы (табл. 3).

Таблица 3. – Общий анализ крови лабораторных мышей группы «Контроль»

Показатель	Измерения	Норма
Гемоглобин, г/л	113,75 ± 0,75	111 ± 4
Гематокрит, %	29,50 ± 0,29	28 ± 2
МСНС, %	34,13 ± 0,31	33 ± 2
СОЭ, мм/ч	2	2 ± 0,1
Сегментоядерные нейтрофилы, %	16,50 ± 0,29	16 ± 1
Лимфоциты, %	64,25 ± 0,48	63 ± 2
Моноциты, %	4,95 ± 0,10	4,7 ± 0,7
Плазматическая клетка	Не содержится	Не содержится

Результаты клинического анализа крови лабораторных мышей показали, что длительное воздействие стресс-факторов на организм животных приводит к существенным изменениям состава крови и структуры эритроцитов.

При морфологической оценке эритроцитов установлено, что длительное воздействие психоэмоционального стресса приводит к развитию у лабораторных мышей пойкилоцитоза. У таких животных процентное отношение деформированных эритроцитов возрастает по сравнению с контролем в 1,6 раз.

Таблица 4. – Морфологическая оценка эритроцитов

Показатель	Группы животных		
	Стресс	Стресс + ЭПБ	Контроль
Деформированные эритроциты, %	7,90 ± 0,33	5,39 ± 0,12	4,95 ± 0,10

При этом у животных, подвергнутых стрессу, но которые употребляли ЭПБ-24, данный показатель оказался практически на уровне значений контрольной группы (табл. 4). Обнаруженные отклонения в морфологии эритроцитов могут свидетельствовать как об окислительных нарушениях, так и изменении метаболизма клеточных мембран.

Также нами было проведено количественное определение концентрации кортизола, как маркера интенсивности стрессового воздействия в сыворотке крови лабораторных мышей. Результаты представлены в таблице 5.

Стресс сопровождался закономерным повышением концентрации кортизола. Наибольшее значение концентрации гормона обнаружено в группе лабораторных мышей «Стресс», которые находились под воздействием стресса и не употребляли ЭПБ-24.

Таблица 5. – Концентрация кортизола у подопытных животных

Гормон	Стресс	Стресс + ЭПБ	Контроль
Кортизол	256,75 ± 13,85	96,06 ± 10,64	57,03 ± 0,03

Полученные данные гормонального исследования крови указывают на то, что применение ЭПБ-24 оказывает положительное влияние на эндокринную функцию семенников и надпочечников лабораторных мышей в условиях стресса. Уровень кортизола снижается в 2,7 раза по сравнению с лабораторными мышами, находящимися в условиях психоэмоционального стресса.

Сравнительный анализ качества эякулята лабораторных мышей показал, что морфофункциональные изменения в репродуктивной системе самцов, возникающие в результате длительного воздействия на организм стресс-факторов, возможно корректировать с помощью ЭПБ-24.

Определено, что в сперме самцов группы «Стресс», которые находились под воздействием стресса и не употребляли ЭПБ-24, по сравнению с «Контролем» снижается количество спермиев в 2,1 раза, подвижность спермиев – в 1,2 раза (табл. 6).

Таблица 6. – Морфологические показатели спермы животных

Характеристики	Стресс	Стресс + ЭПБ	Контроль
Густота	Редкая	Густая	Густая
Количество спермиев, млн.	260,75 ± 1,84	453,50 ± 5,24	541,00 ± 5,12
Подвижность, %	59,28 ± 0,24	70,43 ± 0,17	71,45 ± 0,41
Вязкость, см	0,5	0,5	0,5

Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием психоэмоциональных и физических стресс-факторов ухудшается качество спермы самцов и, вследствие, снижается репродуктивная способность. Применение ЭПБ является высокоэффективным селективным методом улучшения качества эякулята, сниженного в результате длительного воздействия стресс-факторов на организм самцов, о чем свидетельствуют полученные результаты.

## **Выводы:**

1. Психоэмоциональный стресс оказывает существенное влияние на организм самцов, которое проявляется угнетением воспроизводительной способности.

2. Гематологический анализ крови показал, что стресс отрицательно влияет на организм лабораторных мышей. У подопытных животных группы «Стресс», которые находились под воздействием стресса и не употребляли ЭПБ-24, были выявлены отклонения по многим показателям. А у подопытных животных группы «Стресс + ЭПБ», которые находились под воздействием стресса и употребляли ЭПБ-24, не выявлены отклонения от физиологической нормы, что подтверждает положительное влияние использования гормона ЭПБ-24.

3. Длительное воздействие психоэмоционального стресса приводит к развитию у лабораторных мышей пойкилоцитоза. У таких животных процентное отношение деформированных эритроцитов возрастает по сравнению с контролем в 1,6 раз. При этом у животных, подвергнутых стрессу, но которые употребляли ЭПБ-24, данный показатель оказался практически на уровне значений контрольной группы.

4. Морфологические изменения надпочечников и половых желез у подопытных животных группы «Стресс» приводят к увеличению концентрации кортизола в 4,6 раза по сравнению с Контролем.

5. В условиях длительного воздействия стресс-факторов на организм самцов ухудшается качество их спермы: снижается концентрация спермиев в 2,1 раза; двигательная активность в 1,2 раза.

6. Применение ЭПБ-24 нормализует гормоноподобную функцию надпочечников и семенников лабораторных мышей, находящихся в состоянии психоэмоционального стресса: концентрация гормона кортизол снижается в 2,7 раза.

7. Применение ЭПБ-24 является новым эффективным способом улучшения качественных показателей спермы, полученной от самцов, находящихся в условиях постоянного воздействия стресс-факторов. Его применение положительно влияет на количество спермиев, а также позволяет уменьшить число неподвижных спермиев на 9-10 %.

В связи с этим, для профилактики нарушения воспроизводительной способности самцов, находящихся в условиях постоянного воздействия стресса, эффективным является введение в рацион раствора гормона ЭПБ-24 в концентрации 0,002 г/л каждый день в течение 1 недели.

## **Список использованных источников**

1. Козло, Н.Е. Воспроизводство животных / Н.Е. Козло. – М.: КолосС, 1984. – 287 с.
2. Подсевадкин, В.Г. Динамика поведенческих реакций и уровня кортизола у мышей под влиянием комбинированного применения мексидола, диазепама, тимогена и гипербарической оксигенации в условиях иммобилизационного стресса / В.Г. Подсевадкин [и др.]; под общ. Ред. В.Г. Подсевадкин. – Саранск, 2008. – Т. 71. – № 1. – С. 22-25.
3. Sherwood, A. Physiological determinants of hyperreactivity to stress in borderline hypertension / A. Sherwood, A.L. Hinderliter, K.C. Light // Hypertension. – 1995. – 25(3). – P.384-390.

УДК 634.8:579.64

## **АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДРОЖЖЕЙ ВИНОГРАДА КУЛЬТУРНОГО**

**Н.Н. Волынчук, О.Н. Жук**

*Полесский государственный университет, г. Пинск, Беларусь*

**Введение.** Дрожжи широко распространены в природе и наиболее часто встречаются в богатых источниками углерода субстратах. Для дрожжей и других микроорганизмов виноград выступает эдификатором и создает специфическую среду обитания, обеспечивая микроорганизмы данными питательными веществами [10,11]. Микрофлора винограда связана с местоположением виноградника, климатическими и почвенными условиями, антропогенным вмешательством и др. Известно, что дрожжевое сообщество оказывает значительное влияние на здоровье растения, а также принимает непосредственное участие в процессе виноделия, сказываясь на качестве и вкусовых особенностях вина. Дрожжевые грибы нашли широкое применение в различных областях промышленности: пищевой, химической, фармацевтической, сельском хозяйстве [7,3]. В последние годы возрос интерес к изучению дрожжевого сообщества винограда в качестве агентов биоконтроля

фитопатогенов, закономерностей их формирования, как на отдельных растениях, так и в ампелозонах в целом, так как возбудители бактериальных и грибных инфекций винограда представляют собой большую опасность, трудно поддаются контролю и недостаточно изучены [6,9,4].

Целью работы являлось изучение морфологических, физиолого-биохимических показателей изолятов дрожжей корней винограда культурного (*Vitis vinifera*).

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены на кафедре биотехнологии ПолесГУ. Объектами исследований служили изоляты дрожжей, выделенные из ризосферы и эндосферы корней трехлетнего винограда, произрастающего на плантации ОАО «Пинский винодельческий завод». Дрожжи выделяли на твердую питательную среду Сабуро, культивировали при 30°C в течение 72 часов. Контроль роста выделенной культуры осуществляли визуально, учитывая особенности роста на плотных питательных средах [1]. Морфологию живых клеток изучали методом световой микроскопии, используя микроскоп Olympus SC30. Для установления способности сбраживать сахара использовали модификацию метода [2]. Учет результатов производили через 24 ч. Способность дрожжей ассимилировать различные источники углерода определяли путем посева культур дрожжей на агаризованную YP-среду, содержащую определенный источник углерода (сахарозу, галактозу, мальтозу, инулин, лактозу, крахмал – с конечной концентрацией сахаров 0,5 %). Положительным контролем служила агаризованная среда, содержащая глюкозу концентрацией 0,5 %, отрицательным контролем являлась агаризованная среда, не содержащая сахаров. Результаты учитывали на третьи и седьмые сутки после посева. Способность к протеолитической активности определяли путем посева культуры уколом в столбик питательного бульона, содержащего 12% желатина, регистрировали наличие разжижения и его характер. Оценка крахмал-гидролизующей функции дрожжей выполнена на чашках Петри на сусло-агаре с 1% крахмала и действием раствора Люголя по величине зон гидролиза крахмала (при положительном результате среда окрашивалась в синий цвет) [5]. Все тесты выполнили в трех повторях.

**Результаты исследования.** Из ризосферы и эндосферы корней винограда культурного было выделено 8 изолятов дрожжей. При последовательном пересеве выделенных культур дрожжей на среду Сабуро наблюдали колонии разнообразной окраски, размера и формы (таблица 1).

Таблица 1. – Морфологические признаки выделенных изолятов дрожжей корней винограда

Морфология колоний	Описание	Морфология колоний	Описание
 1	Колонии диаметром 2–3 мм, плотные, сухие, круглой формы, поверхность блестящая. Цвет колоний розовато-бежевый. Клетки крупные, округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.	 5	Колонии диаметром 1–2 мм, круглой формы, край колоний ровный, поверхность матовая. Цвет колоний светло-бежевый. Клетки крупные, овальной формы, наблюдается почкование клеток.
 2	Колонии диаметром 1-3 мм, блестящие, слизистые, с ровным краем. Цвет колоний Оранжевый. Клетки овальной и удлиненной формы, наблюдается активное почкование клеток.	 6	Колонии диаметром до 4 мм, матовые, край мицелиального типа. Цвет бежевый. Клетки округлой формы, располагаются одиночно.
 3	Колонии диаметром до 4 мм, слизистые, край ровный. Цвет колоний желто-коричневый. Клетки округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.	 7	Колонии диаметром 3 мм, слизистые, круглой формы, край колоний ровный, поверхность блестящая, консистенция мажущаяся. Цвет колоний розовый. Клетки округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.

	Колонии диаметром 2–3 мм, круглой формы, поверхность матовая. Цвет колоний белый Клетки крупные, округлой формы, наблюдается почкование клеток.		Колонии диаметром до 3 мм, слизистые, край ровный. Цвет колоний желтый. Клетки округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.
---	--	--	---

Как продемонстрировано в таблице, большинство колоний имеют диаметр около 3 мм, круглую форму ровными краями, блестящей поверхностью и мажущейся консистенцией. Клетки округлой формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток.

К культуральным (макроморфологическим) свойствам относятся характерные особенности роста микроорганизмов на питательных средах. По результатам исследования составлена карта (таблица 2) выявленных признаков выделенных штаммов культур дрожжей на плотных стандартных питательных средах.

Из данных таблицы следует, что выделенные культуры дают обильный рост на питательной среде УЕРД. При этом стоит отметить, что при культивировании изолята №6 на плотных средах Лундина и виноградном сусле образуются колонии S-типа, тогда как изменение поверхности, профиля и размера колоний на среде Городковой свидетельствует о явлении диссоциации.

Таблица 2. – Культуральные свойства выделенных чистых культур дрожжей корней винограда

Наименование питательной среды	Характер роста колоний				
	Размер	Форма, профиль	Поверхность	Цвет	Край
УЕРД	Крупные 5 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	Светло-розовый (7), желтый (2,3,8), бежевый (1,4,5,6)	Ровный
Лундина	Средние 3-4 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	Белый, №2–желтый	Ровный
Городковой	Средние 3-4 мм	Округлая, конусов-я	Блестящая Матовая (6)	Белый, №2–желтый	Ровный
Виноградное сусло	Средние 3-4 мм	Округлая, выпуклая	Блестящая	желтый (2,3,8), белый (4), бежевый (1,4,5,6,7).	Ровный

Все изоляты обладают амилолитической активностью, протеолитической активностью не обладают. При определении оптимальных температур для роста исследуемых изолятов на агаре Сабуро, установлено, что оптимальной температурой для культивирования изолятов № 1, 2, 5, 8 является температурный диапазон 20-30°C. Для изолята №3, 4, 6, 7 – 20-38°C. Все изоляты можно отнести к группе мезофильных микроорганизмов.

Характеристика способности исследуемых дрожжей сбраживать сахара приведена в таблице 3. О способности к сбраживанию сахаров свидетельствовало образование газа в сосуде с водой. Как видно из таблицы, только дрожжевой изолят №4 способен сбраживать отдельные сахара, в то время как остальные изоляты – не способны сбраживать данные сахара.

Таблица 3. – Характеристика способности изучаемых дрожжей сбраживать сахара\*

Источник углерода	Изоляты дрожжей							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Глюкоза	-	-	-	+	-	-	-	-
Галактоза	-	-	-	-	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	+	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	+	-	-	-	-
Инулин	-	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	+	-	-	-	-
Крахмал	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Условные обозначения : «+» – наличие роста дрожжей; «-» – отсутствие роста дрожжей; \* – культивирование в течение 7 суток при температуре 25°C.

Согласно данным литературы, дрожжи, пигментация которых обусловлена наличием каротиноидных пигментов, а также дрожжи, образующие крахмалоподобные соединения (*Holtermannia* и *Cryptococcus*), как правило, не способны сбраживать исследуемые сахара [6,8], что является подтверждением их таксономической принадлежности.

Характеристика способности исследуемых дрожжей к росту и ассимиляции различных источников углерода приведена в таблице 4. Согласно приведенным данным, у некоторых дрожжей наблюдался слабый рост в исследуемых средах, что объясняется возможной медленной адаптацией культур дрожжей к некоторым источникам углерода.

Таблица 4. – Характеристика способности изучаемых дрожжей к росту и ассимиляции источников углерода\*

Источник углерода	Изоляты дрожжей							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	+/-	-	+	+	+	+/-	+
Мальтоза	+	+/-	-	+	+	+	+	+/-
Инулин	+	+/-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	+	-	-	+/-	-	-	-	-
Крахмал	+	+	-	-	-	-	-	-

Примечание – Условные обозначения : «+» – наличие роста дрожжей; «-» – отсутствие роста дрожжей; «+/-» – слабый рост дрожжей; \* – культивирование в течение 7 суток при температуре 25°C

Наибольшую активность в ассимиляции источников углерода проявил изолят № 1. В целом плохо ассимилируемыми источниками углерода были инулин, лактоза и крахмал; средне ассимилируемыми – мальтоза, сахароза; отлично ассимилируемыми – глюкоза, галактоза.

По результатам морфологической и физиолого-биохимической идентификации выделенные 8 штаммов дрожжей, относятся к 6 родам: №1,3 – *Cryptococcus sp.*, №2,8 – *Sporobolomyces*, №4 – *Candida*, №5 – *Rhodospordiobolus*, №6 – *Rhodotorula*, №7 – *Metschnikowia*.

**Заключение.** Корни винограда культурного, произрастающего на плантации ОАО «Пинский винодельческий завод», заселены штаммами дрожжевых грибов не менее чем шести родов – *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia* и *Candida*. Требуется дальнейшее изучение данных изолятов в качестве агентов биоконтроля фитопатогенов, закономерностей их формирования, как на отдельных растениях, так и в ампелоценозах в целом.

#### Список использованных источников

1. Бабьева, И. П. Биология дрожжей / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов. – М.: КМК, 2004. – 239 с.
2. Бабьева, И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И. П. Бабьева, В. И. Голубев. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
2. Банницына, Т.Е. Дрожжи в современной биотехнологии / Т.Е. Банницына [и др.] // Вестник МАХ. – 2016. – № 1 – С. 24-29.
3. Васильева, Е.Н. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве / Е.Н. Васильева, Г.А. Ахтемова, В.А. Жуков // Genetic basis of ecosystems evolution. – 2019. – №.17. – P. 19 – 32.
4. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
5. Савчик, А.В. Молекулярно-генетическая идентификация дрожжевых грибов из фонда белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов // пищевая промышленность: наука и Технологии Vol. 13, № 3 (49) 2020 С. 61 – 69.
4. Belda, I. From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the «terroir» concept / I. Belda et al. // Front Microbiol. – 2017. – No. 7. – P. 805 – 821.
5. Doty, S.L. Endophytic yeasts: biology and applications, in symbiotic endophytes / S.L. Doty et al. // Springer. – 2013. – P. 335 – 343.
6. Kurtzman, P. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways / P. Kurtzman [et al.] // FEMS Journals. – 2015. – P. 1-17.

7. Wassermann, B. Plant Health and Sound Vibration: Analyzing Implications of the Microbiome in Grape Wine Leaves / B. Wassermann et al. // Pathogens. – 2021. – No. 10. – P. 63.

8. Zarraonaindia, I. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota / I. Zarraonaindia [et al.] // MBio. – 2015. – No. 6. – P. 24 – 39.

УДК 633.2: 663.15

## КОРМОВАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ РУБЦОВОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ

Н.А. Головнева<sup>1</sup>, Н.Е. Рябая<sup>1</sup>, А.Н. Морозова<sup>1</sup>, А.А. Самарцев<sup>1</sup>, А.Н. Михалюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,

<sup>2</sup>Гродненский государственный аграрный университет, Беларусь  
*biochem\_lab@mbio.bas-net.by*

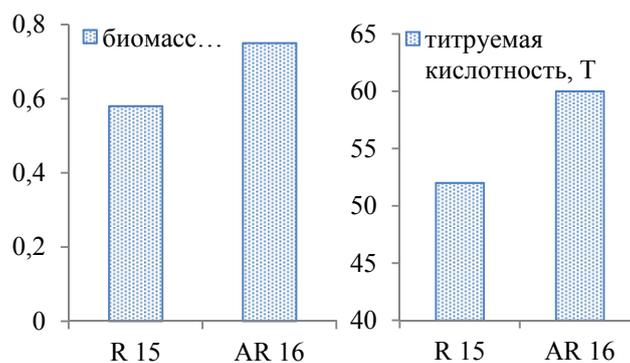
Ацидоз рубца – широко распространённое заболевание у жвачных животных, которое характеризуется усиленной продукцией в рубце молочной кислоты и смещением кислотно-щелочного равновесия в организме животного.

В последние годы доказано, что ацидоз рубца носит главным образом алиментарный характер [1]. На начальных этапах заболевания ацидоз проявляется в маловыраженной субклинической форме, однако при рН 5,5 включается каскадное развитие патологий [2-4].

Популяция микроорганизмов в рубце является экосистемой со сложными трофическими связями и функционирует по принципу саморегуляции. Отклонение от оптимальных условий изменяет активность и состав микробиоценоза, что приводит к нарушению пищеварения и отрицательно отражается на здоровье и продуктивности животных. Установлено, что снижение рН рубцовой среды до 5,2-5,6 (при физиологической норме рН 6,5-7,5), приводит к прекращению роста целлюлолитических микроорганизмов и снижению переваримости клетчатки. При этом наблюдается активный рост бактерий, продуцирующих молочную кислоту. Более того, в рубце в условиях избытка легкометаболизируемых сахаров и при наличии тех или иных ограничивающих рост микроорганизмов факторов, происходит образование резервных продуктов метаболизма, многие из которых, например, липополисахариды, являются токсичными для организма-хозяина и вызывают заболевания животных (ламинит копыт, хромоту). Дополнительным фактором, отрицательно влияющим на организм животного, является снижение продукции биотина и других витаминов микробиотой рубца [4-5]. Особое значение имеет увеличение содержания в рубце жвачных медленно метаболизируемого организмом *D*-изомера молочной кислоты, даже относительно небольшая концентрация которого может привести к значительному снижению рН. В оптимальных условиях существует баланс между выработкой молочной кислоты в рубце, ее поступлением с кормом (из силоса), использованием бактериями рубца и ее выходом из рубца. В рубце обнаружено несколько групп бактерий (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantum*, *Propionibacterium freudenreichii*), которые ферментируют молочную кислоту, тем самым эффективно повышая рН содержимого рубца. Однако бактерии, усваивающие молочную кислоту, растут в несколько раз медленнее микроорганизмов, которые метаболизируют крахмал [2]. Вследствие этого дисбаланса микробиоценоза в рубце наблюдается нарушение метаболических процессов, что приводит к размножению патогенных микроорганизмов и риску внутреннего отравления.

С целью коррекции рубцового пищеварения и предотвращения ацидозов использовали пропионовокислые бактерии (ПКБ) – *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* R 15 и полученный в результате адаптивной селекции к повышенной кислотности штамм *Pr. freudenreichii* subsp. *shermanii* AR 16 [6].

При культивировании в условиях с пониженной кислотностью в питательной среде с исходным рН 5,5 накопление биомассы полученного штамма *Pr. freudenreichii* AR 16 в 1,3 раза больше, титруемая кислотность – на 15% выше, чем у исходного штамма *Pr. freudenreichii* R 15 (рисунок).



**Рисунок – Биомасса и титруемая кислотность *Pr. freudenreichii* R 15 и *Pr. freudenreichii* AR 16 к 42 ч роста на среде с глюкозой и молочной кислотой (1:1) в качестве источников углеродного питания, pH 5,5**

Исследование культур показало, что *Pr. freudenreichii* AR 16 отличается более высоким уровнем жизнеспособности клеток при выращивании на среде с молочной кислотой –  $2 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, тогда как у *Pr. freudenreichii* R 15 в этих условиях показатель КОЕ/мл составил  $1 \cdot 10^5$  (таблица 1).

Таблица 1. – Жизнеспособность *Pr. freudenreichii* R 15 и *Pr. freudenreichii* AR 16 на различных питательных средах

Источник углеродного питания в среде	Штамм	Количество жизнеспособных клеток в 1 мл среды
Глюкоза, pH 7,2	AR 16	$1.0 \cdot 10^9$
	R 15	$2,1 \cdot 10^9$
Глюкоза+ молочная кислота, pH 5,5	AR 16	$2 \cdot 10^8$
	R 15	$1 \cdot 10^5$

Из культуральной жидкости, содержащей клетки двух штаммов пропионовокислых бактерий с показателем КОЕ/мл  $2,0 \cdot 10^9$  получена кормовая добавка Румибакт с содержанием жизнеспособных лиофилизированных ПКБ в 1 г  $1,2 \cdot 10^{12}$  КОЕ.

С целью испытания эффективности добавку вводили в состав комбикорма в условиях молочно-товарного комплекса «Дубовка» СПК им. Денщикова Гродненского района. При проведении опытов на поголовье высокопродуктивных коров использовался метод групп-аналогов. Проведено исследование влияния кормовой добавки на показатели молочной продуктивности и качественные показатели молока коров.

Установлено, что у коров (по 100 голов в группах), которым в состав комбикорма вводили Румибакт, валовый надой молока натуральной жирности был выше на 2,35% по сравнению с контролем, при этом жирность молока на 0,21 п.п. выше. Надой молока базисной жирности оказался в опытной группе больше на 74,7 кг или 8,2% (таблица 2).

Таблица 2. – Показатели молочной продуктивности коров.

Показатели	контроль	опыт
Валовый надой молока за опытный период, кг	891	912
Среднесуточный надой коров в среднем за опыт, кг	$29,7 \pm 0,90$	$30,4 \pm 0,73$
Процент к контролю	100	102,35
Жирность молока коров в среднем за опыт, %	$3,70 \pm 0,03$	$3,91 \pm 0,04$
Среднесуточный надой в пересчете на базисную жирность, кг	$30,5 \pm 1,10$	$33,0 \pm 0,87$
Получено молока за опыт в пересчете на базисную жирность, кг	915,8	990,5

Результаты исследования биохимических показателей молока свидетельствуют, что использование в составе комбикорма для дойных коров кормовой добавки на основе ПКБ способствует

повышению уровня жира в молоке на 0,29 п.п, белка – на 0,11 п.п. по сравнению с молоком контрольной группы (таблица 3).

Таблица 3. – Биохимические показатели молока и его качество

Показатели	Группы				± к контролю п.п.
	контрольная		опытная		
	1**	2***	1	2	
Жир, %	3,62±0,26	3,78±0,31	3,75±0,19	4,07±0,39	+0,29
СОМО, %	8,57±0,31	8,71±0,20	8,54±0,29	8,89±0,26	+0,18
Белок, %	3,09±0,16	3,14±0,25	3,09±0,11	3,25±0,26	+0,11
Лактоза, %	4,70 ± 0,07	4,76 ± 0,04	4,65 ± 0,04	4,83 ± 0,10	+0,07
Вода, %	0	0	0	0	-
Минеральные вещества, %	0,68±0,07	0,69±0,09	0,68±0,188	0,70±0,119	+0,01
Кетоны, мг%*	~100	~110	~90	-	-
Мочевина, мг%*	~28-30	~25-30	~25-30	~20-25	-
Точка замерзания, °С	- 0,54	- 0,54	- 0,54	- 0,56	-
Соматические клетки, тыс. КОЕ/см <sup>3</sup>	142,0±2,26	140,0±3,57	148,0±2,98	136±3,12	-4,0
КМАФАнМ, тыс. КОЕ/см <sup>3</sup>	131	123	129	110	-13,0
Плотность, * А	27,4±1,53	27,8±1,46	27,5±1,77	28,8±1,22	+1,0

Примечания: \* – использовались тест-полоски Ketomilkkit и Uremilkkit.

1\*\*без использования добавки на начало опыта;

2\*\*\*во время использования добавки, конец опыта.

Проведена органолептическая оценка образцов молока от коров контрольной и опытной групп по 5-ти бальной шкале. Результаты экспертной оценки показали, что все пробы молока характеризуются отличным вкусом и запахом и с учетом физико-химических и микробиологических показателей молоко может быть отнесено к сорту «Экстра» по СТБ 1598-2006.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что скармливание комбикорма с добавкой Румибакт на основе ПКБ высокопродуктивным дойным коровам способствует увеличению среднесуточного надоя молока натуральной жирности на 2,35% по сравнению с контролем при одновременном повышении жирности молока на 0,21 п.п., что свидетельствует об эффективности кормовой добавки Румибакт. Годовой экономический эффект от использования Румибакт в расчете на 1000 голов коров может составить 48,42 тысячи рублей (без учета стоимости кормовой добавки).

#### Список использованных источников

1. Харитонов, Е.Л. Физиология и биохимия питания молочного скота / Е.Л. Харитонов. – Боровск : Оптима пресс, 2011. – 372 с.
2. Direct-fed Microbials for Ruminant Animals /Ja Kyeom Seo [et al.] // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2010. – Vol. 23, № 12. – P.1657-1667.
3. Архипов, А.В. Углеводы кормов: функции, достоинства, проблемы / А.В. Архипов // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2014. – № 9. – С. 46-63.
4. Калюжный, И.И. Ацидоз рубца: автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.01/ И.И. Калюжный. – Воронеж, 1996. – 21 с.
5. Малков, М.А. Методические рекомендации по управлению физиологическим состоянием КРС в различных жизненных периодах / М.А. Малков [и др.] – СПб, 2016. – 23 с.
6. Головнева, Н.А. Особенности культивирования пропионовокислых бактерий – компонентов биопрепаратов / Н.А. Головнева [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / редкол: Э.И. Коломиец [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 10. – С.32-44.

## ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ЧИСЛЕННОСТЬ АММОНИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ОЗИМОЙ РЖИ

**Н.М. Дайнеко, И.И. Концевая, С.Ф. Тимофеев, А.В. Бондарева**

*Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Беларусь [dajneko@gsu.by](mailto:dajneko@gsu.by)*

Сохранение почвенного плодородия в условиях интенсивного земледелия является весьма актуальным, а изучение факторов, влияющих на него, является теоретически и практически необходимым. Почвенная микрофлора и микробиологические процессы играют особую роль в плодородии почвы [1].

Микрофлора почвы по количественному и видовому составу значительно колеблется в зависимости от химического состава почвы, ее физических свойств, реакции рН, влагоемкости, степени аэрации [2].

Почвенные микроорганизмы являются ключевым фактором почвообразования, и им принадлежит ведущая роль в процессе минерализации и гумификации почвенного органического вещества. Изучение микробных сообществ и влияния на них микробных биопрепаратов является актуальным и практически значимым [2].

Исследования выполняли в 2020-2021 гг. на землях агрокомбината «Южный» Гомельского района Гомельской области. Объектом исследований являлась биологическая активность агрономически полезных групп при обработке микробными биопрепаратами «Полибакт», «Гордебак» и «Ресойлер» посевов озимой ржи.

Комплексный микробный препарат «Полибакт», который мы применяли в своих исследованиях, восстанавливает микробиоценоз почвы и повышает урожайность сельскохозяйственных культур, разработан в Институте микробиологии НАН РБ. «Полибакт» стимулирует жизнедеятельность микроорганизмов основных эколого-трофических групп, ускоряет процессы минерализации растительных остатков в почве. Характеризуется фитопротекторным, ростстимулирующим, деструктивным, фосфатмобилизующим и азотфиксирующим свойствами. Экологически безопасен.

Микробный биопрепарат «Гордебак» разработан в Институте микробиологии НАН РБ, позволяет получить экологически чистую продукцию и снизить пестицидную нагрузку на агробиоценозы. Не фитотоксичен, безвреден для человека и животных. Повышает урожайность зерновых культур на 5-10%, обеспечивая их высокие технологические свойства.

Биопрепарат «Ресойлер» разработан РУП «Институт защиты растений» не содержит генетически модифицированных организмов, применяется для снижения численности фитопатогенных и токсинообразующих грибов, оздоровления почвы, ускорения разложения растительных остатков в почве, а также для увеличения продуктивности растений на 10-15%.

Опыт был заложен на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве осенью 2020 г.:

1) контроль – без обработки посевов озимой ржи микробными биопрепаратами «Полибакт», «Гордебак» и «Ресойлер»;

2) обработка посевов озимой ржи микробным биопрепаратом «Полибакт»;

3) обработка посевов озимой ржи микробным биопрепаратом «Гордебак»;

4) обработка посевов озимой ржи микробным биопрепаратом «Ресойлер».

Агрохимическая характеристика почвы опыта следующая: рН в КСl – 5,9; фосфор – 281 мг/кг; калий – 262 мг/кг.

Площадь опытных делянок составляла 5 м<sup>2</sup>, повторность опытов – 4-х кратная. Норма расхода биопрепаратов составляла 3 л/га.

Образцы почвы на микробиологический анализ отбирали с пахотного горизонта 0-10 см в течение вегетации в основные фазы развития озимой ржи (выход в трубку, цветение, восковая спелость). Численность эколого-трофических групп микроорганизмов определяли по общепринятым методикам [3].

Микробиологическую индикацию почвы выполняли согласно общепринятым в почвенной микробиологии методам [4, 5].

Для оценки влияния препаратов «Полибакт», «Гордебак» и «Ресойлер» на микробонаселение почвы (зимогенную, олиготрофную, автохтонную группы) использовали чашечный метод Коха, с помощью которого определяли численность аммонифицирующих, амилолитических, олигонитрофильных, олигокарбофильных, автохтонных микроорганизмов на селективных питательных сре-

дах: мясопептонном (МПА), крахмало-аммиачном (КАА), среда Эшби, голодном (ГА), нитритном (НА) агарях, соответственно. Все посеы проводили в трехкратной повторности.

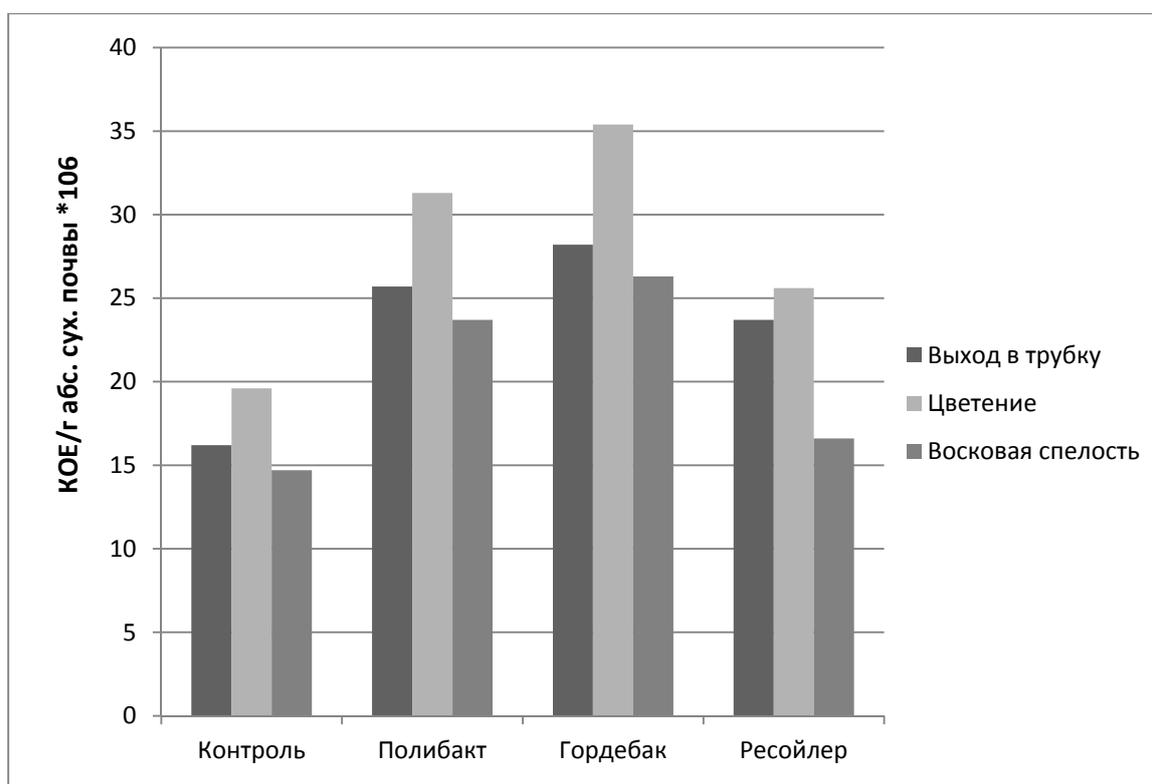
Численность микроорганизмов определяли в колониеобразующих единицах (КОЕ), пересчитывали на 1 г абсолютно сухой почвы.

Расчет эколого-физиологических индексов и коэффициентов выполняли по [6].

В данном сообщении рассматривается только численность аммонифицирующих бактерий по фазам вегетации.

Аммонифицирующие бактерии – бактерии, способные использовать аминокислоты и белки для получения энергии. Они обеспечивают процессы гниения, разлагая мертвую органику до простых веществ, и, тем самым, играют ключевую роль в круговороте веществ [5].

Анализ численности аммонифицирующих бактерий при обработке посевов озимой ржи микробными биопрепаратами показал, что в фазе выхода в трубку наибольшая численность наблюдалась в варианте с «Гордебак», что в 1,7 раза больше, чем в контроле и в 1,6 раза больше, чем в варианте «Полибакт». Несколько меньшая численность отмечалась в варианте с «Ресойлер», где численность в 1,2 раза была выше, чем в контроле.



**Рисунок – Численность аммонифицирующих бактерий по фазам вегетации**

Рассматривая численность аммонифицирующих бактерий в фазе цветения видно (рисунок), что в варианте с «Гордебак» также отмечалась более высокая численность по сравнению с другими вариантами, а по сравнению с контролем она была в 1,8 раза больше. При внесении «Полибакт» численность аммонифицирующих бактерий по сравнению с контролем увеличилась в 1,6 раза, а при использовании «Ресойлер» в 1,3 раза.

В фазе восковая спелость более высокая численность аммонифицирующих бактерий зафиксирована в варианте «Гордебак», что в 1,7 раза больше, чем в контроле. В варианте с «Полибакт» численность аммонифицирующих бактерий оказалась в 1,6 раза, а в варианте с «Ресойлер» в 1,2 раза выше, чем в контроле.

Численность аммонифицирующих бактерий под влиянием используемых микробных биопрепаратов в изучаемых фенофазах развития увеличилась по сравнению с контролем в 1,2-1,8 раза.

Рассмотрение численности бактерий по фазам вегетации в зависимости от биопрепарата в каждом варианте опыта выявило, что численность аммонифицирующих бактерий в контроле в фазе цветения в 1,2 раза выше, чем в фазе выхода в трубку и в 1,3 раза больше, чем в фазе восковой спелости. В варианте «Полибакт» численность в фазе цветения в 1,2 раза выше, чем в фазе выхода

в трубку и в 1,3 раза больше, чем в фазе восковой спелости. В варианте «Гордебак» численности в фазе цветения в 1,3 раза выше, чем в фазе выхода в трубку и в 1,4 раза больше, чем в фазе восковой спелости. В варианте «Ресойлер» численность в фазе цветения в 1,3 раза выше, чем в фазе выхода в трубку и в 1,6 раза в фазе восковой спелости.

Таким образом, в каждом варианте опыта наибольшая численность отмечена в фазе цветения, наибольшая численность аммонифицирующих бактерий наблюдалась в варианте «Гордебак», несколько ниже – в варианте «Полибакт», еще меньшая численность зафиксирована в варианте «Ресойлер».

#### Список использованных источников

1. Демина, О.Н. Влияние минеральных удобрений на миклофлору пахотного чернозема лесостепной зоны Зауралья / О.Н. Демина, Д.И. Еремин. – Вестник КрасГАУ, 2020. – С. 63-71.
2. Дайнеко, Н.М. Сравнительный анализ численности микроорганизмов на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве и минерализованном торфянике под влиянием микробных деструкторов / Дайнеко Н.М., Концевая И.И., Тимофеев С.Ф., Козел М.С. // Известия ГГУ им. Ф. Скорины. – 2019. – № 3 (126). – С. 15 – 20.
3. Основные микробиологические и биохимические методы исследования почв // под ред. Возняковской Ю. М. –Л.: ВНИИСХМ, 1987. – 47 с.
4. Теппер, Е.З., Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239 с.
5. Титова, В. И. Методы оценки функционирования микробоценоза почвы, участвующего в трансформации органического вещества: науч. метод. пособие / В.И. Титова, А.В. Козлов. – Н. Новгород: Нижегород с.-х. акад., 2012. – 192 с.
6. Гусев М.В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л. А.Минева. – 4-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.

УДК 639.3.043, 639.371.7

### СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕЦЕПТУРЫ КОМБИКОРМОВ ДЛЯ КЛАРИЕВОГО СОМА (*CLARIAS GARIEPINUS BURCHELL*) ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ СУСПЕНЗИИ ХЛОРЕЛЛЫ И ЖМЫХОВ МАСЛИЧНЫХ КУЛЬТУР

Н.П. Дмитривич<sup>1</sup>, Т.В. Козлова<sup>2</sup>, А.И. Козлов<sup>2</sup>, Н.А. Кузнецов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь natali-rigo@mail.ru

<sup>2</sup>Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Беларусь

Сокращение уловов океанических гидробионтов привело к осознанию важности и необходимости развития разнообразных форм аквакультуры. Ни одно из направлений современной аквакультуры не может функционировать без качественного рыбопосадочного материала, необходимого для последующего выращивания товарной рыбы. Объясняется это тем, что именно на начальных этапах онтогенеза закладываются потенциальные возможности для дальнейшего роста организма. Одновременно с этим вид и состав корма оказывают решающее влияние на обмен веществ в организме, рост и развитие, накопление массы и продуктивность рыб. Именно поэтому в кормах для молоди должны присутствовать все необходимые питательные вещества в форме, доступной для их пищеварительной системы и усвоения [8].

Характерной особенностью питания большинства рыб является высокая потребность в протеине, содержание которого в кормах для молоди рыб должно составлять 50–60 % при наличии полноценного белка со всеми незаменимыми аминокислотами, так как их отсутствие или недостаток снижает темп роста [12]. Обычно содержание жира в рационах рыб колеблется в пределах 12–22 %, однако это значение можно довести до 20–25 % (при содержании белка 35–45 %), повышая этим их качество [7]. Углеводы, в свою очередь, служат не самым основным источником энергии для рыб [16]. Эффективность усвоения этого компонента пищи у гидробионтов значительно ниже, чем у теплокровных животных, в связи с этим содержание углеводов в кормах для молоди рыб не должно превышать 15–30 % [7, 12]. Следует учитывать также, что при наличии в их рационе достаточного количества жиров и углеводов, белки используются для построения тканей и органов организма, а при недостатке – как источник энергии [13].

Известно, что водоросли могут использоваться как дополнительный источник для замены синтетических минеральных и витаминных добавок при производстве комбикормов, так как их биодоступность для живых организмов выше [19]. Мировая аквакультура располагает большим опытом применения в кормах при выращивании товарной рыбы суспензии хлореллы, так как рыбы, в том числе и хищные, способны переваривать водоросли с неразрушенной клеточной стенкой и усваивать входящие в состав клеток питательные вещества [20]. Расщепление клеточных стенок водорослей в организме рыб происходит за счет наличия ферментов, выделяемых симбионтной микрофлорой кишечника [3, 4] обеспечивающих переваривание, в том числе и целлюлазы. [4].

Пресноводная водоросль *Chlorella vulgaris* в зависимости от условий культивирования может содержать до 50–70 % белка, 30 % углеводов, 5 % жира, 3 % минеральных солей и витаминов, а также фенольные соединения, имеющие свойства антиоксидантов. Замечено, что наибольший эффект достигается при использовании суспензии, а не сухой массы, так как при этом рыбы получают не только клетки водорослей, но и все продукты их жизнедеятельности, находящиеся в растворе, а также все минеральные вещества, которые находятся в составе питательной среды [1, 5, 14, 15, 19].

Производство сбалансированного комбикорма для молоди ценных видов рыб, в частности для клариевого сома, невозможно без введения в его состав растительных компонентов. Основное место занимают жмыхи и шроты различных сельскохозяйственных культур, в том числе и масличных. Среди масличных культур довольно широкое применение имеет рапс, так как его жмых (шрот) имеет масличность 7–12% (1–5%) и содержание сырого протеина 37–38% (до 42%). Другим ценным компонентом комбикормов является сафлор красильный, который по составу жирных кислот близок к подсолнечнику. Жмых из необрушенных семян сафлора содержит 6–7% масла, 24–25% крахмала и 18% белка, что делает его перспективным компонентом комбикормов для молоди рыб [9, 10].

*Цель исследования.* В Республике Беларусь отсутствуют предприятия, производящие комбикорма для молоди клариевого сома. В связи с этим, необходима разработка рецептуры отечественных комбикормов, удовлетворяющих пищевые потребности данного вида рыб, используя при этом недорогие, доступные и эффективные компоненты с целью импортозамещения. Поэтому целью настоящих исследований являлось определение влияния и эффективности применения комбикормов, содержащих суспензию хлореллы и жмыхи масличных культур рапса и сафлора, на темп роста молоди сомовых рыб.

*Материалы и методы.* Объектом исследований являлся африканский клариевый сом (*Clarias gariepinus* (Burchell)). В качестве ингредиентов для совершенствования рецептур отечественных комбикормов применяли суспензию хлореллы (*Chlorella vulgaris* (Beijerinck)), жмыхи масличных культур: рапса (*Brassica napus* L.) и сафлора красильного (*Carthamus tinctorius* L.).

Продолжительность опыта по кормлению молоди клариевого сома составила 158 дней. Плотность посадки рыб во всех емкостях была одинаковой и равнялась 25 экз. на емкость. Объем одной емкости – 0,15 м<sup>3</sup>. При выращивании молоди температура воды и гидрохимические показатели находились в пределах норм, рекомендуемых для выращивания молоди сомовых рыб. Гидрохимический режим соответствовал рыбоводным требованиям для бассейнового выращивания сомовых рыб. Во время исследований температура воды колебалась в пределах 26–27°C. Концентрация растворенного в воде кислорода – в пределах от 4,0 до 5,0 мг/л. Амплитуда колебаний водородного показателя (рН) – от 7,0 до 8,0. Показатель аммиак/аммоний (NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub> мг/л) регистрировался в пределах 0,04 до 0,56. Значения нитратов (NO<sub>3</sub>, мг/л) колебались в пределах 0,0–20,0. Показатель нитритов (NO<sub>2</sub>, мг/л) находился в пределах 0,3–0,5. Железо общее иногда имело показатель 0,2 мг/л, сразу после добавления водопроводной воды в систему.

Для кормления рыб использовали комбикорм с добавлением суспензии хлореллы и жмыхов рапса и сафлора, а также импортный комбикорм. Режим кормления молоди клариевого сома подбирали, учитывая особенности возраста и жизненного цикла. Молодь рыб кормили 3 раза в 8.00, 13.00 и 18.00 часов, что позволяло рыбе полностью переваривать потребленный корм. Количество задаваемого комбикорма зависело от массы выращиваемых рыб и определялось рыбоводными нормами [13, 17] и рекомендациями производителей комбикормов. Рыбоводно-биологические показатели, среди которых масса, длина тела, абсолютный и относительный приросты, выживаемость и кормовой коэффициент, определяли по общепринятым в рыбоводстве методикам [2, 11].

*Результаты.* При разработке рецептур комбикормов для молоди сомовых рыб обращали внимание на сохранение питательности и поддержание основных показателей качества на уровне,

требуемом физиологическими особенностями и нормативными документами, регламентирующими качество комбикормов. Как известно, стартовые корма для клариевого сома должны содержать 40–50% протеина, 14–20% жира и 5–10% углеводов. На основании этого, усовершенствован состав комбикормов путем добавления 3% жмыха рапса и 3% жмыха сафлора красильного на кг массы комбикорма (опытный комбикорм №2), 3% суспензии хлореллы, 3% жмыха рапса и 3% жмыха сафлора красильного на кг массы комбикорма (опытный комбикорм №3) (таблица 1).

Таблица 1. – Рецептуры разработанных стартовых комбикормов для сомовых рыб с добавлением суспензии хлореллы и жмыхов рапса и сафлора красильного (% в рецептуре)

Состав	Опытный комбикорм №1 (КС)	Опытный комбикорм №2 (КС + 3% рапса + 3% сафлора)	Опытный комбикорм №3 (КС + 3% рапса + 3% сафлора + 3% хлореллы)
Мука рыбная, кормовая, %	58,0	58,0	55,0
Жир рыбий, %	7,0	7,0	7,0
Жмых рапса, %	–	3,0	3,0
Черный пищевой альбумин, %	5,0	5,0	5,0
Ракушка, %	4,0	4,0	4,0
Мука пшеничная, первый сорт, %	23,5	17,5	17,5
Хлорелла, %	–	–	3,0
Жмых сафлора, %	–	3,0	3,0
Лигнобонд, %	1,5	1,5	1,5
Премикс Д-ПК-100 Б20 НГР-3, %	1,0	1,0	1,0
Всего, %	100	100	100

В качестве контроля использовали комбикорма без суспензии хлореллы и жмыхов масличных культур (опытный комбикорм №1) и импортный комбикорм марки «Aller Aqua» (Bronze). Плотность суспензии водоросли хлореллы, вводимой в комбикорма, составляла 8 млн. кл/мл. Суспензией хлореллы заменяли наиболее дорогостоящие и трудно усваиваемые компоненты комбикормов.

Кормление молоди клариевого сома импортным комбикормом и опытными комбикормами с добавлением суспензий хлореллы и/или жмыхов масличных культур обеспечило одинаковую выживаемость во всех группах – 100,00 % (таблица 2).

Таблица 2. – Рыбоводные показатели молоди клариевого сома

Показатель	Опытный комбикорм			Контроль («Aller Aqua» Bronze)
	№1 (КС)	№2 (КС + 3% рапса + 3% сафлора)	№3 (КС + 3% рапса + 3% сафлора + 3% хлореллы)	
Масса в начале опыта, г	127,20±14,01	135,20±13,71	132,60±13,65	124,60±12,13
Масса в конце опыта, г	506,50±15,71	517,00±16,30	552,50±14,73	515,00±16,96
Абсолютный прирост, г	379,30	381,80	419,90	390,40
Относительный прирост, %	165,33	193,64	201,28	199,36
Выживаемость, %	100	100	100	100
Кормовой коэффициент, ед.	1,52	1,51	1,38	1,48

Абсолютный прирост был максимальным при кормлении опытным комбикормом №3, с суспензией хлореллы и жмыхами рапса и сафлора. Показатель относительного прироста при использова-

нии опытного комбикорма №1 был самым низким и составил 165,33%. Более высокие значения относительного прироста массы получены при применении опытного комбикорма №2 и импортного комбикорма (193,64% и 199,36% соответственно). Максимальное значение данного показателя отмечено при кормлении молоди клариевого сома опытным комбикормом № 3 (КС + 3% рапса + 3% сафлора + 3% хлореллы) – 201,28%. Это выше в 1,09–1,22 раза, чем при применении опытных комбикормов №1 и №2 и контрольного комбикорма.

Такой важный показатель эффективности корма, как кормовой коэффициент, у импортного комбикорма составил 1,48, что было несколько выше заявленного производителем. Кормовые коэффициенты опытных комбикормов №1 (КС) и №2 (КС + 3% рапса + 3% сафлора) имели достаточно близкие значения – 1,52 и 1,51 соответственно. Отмечено, что одновременное применение в составе опытного комбикорма №3 суспензии хлореллы и жмыхов рапса и сафлора красильного привело к снижению кормового коэффициента до 1,38, что в 1,07–1,10 раз ниже по сравнению с другими комбикормами.

С учетом увеличения темпа роста, снижения кормового коэффициента в результате кормления, а также цен разработанных и импортного комбикормов, была получена экономия денежных средств. Коммерческая стоимость импортных кормов «Aller Aqua» (Bronze) в период выращивания сомовых рыб составляла 1,75 \$/кг, а стоимость опытных комбикормов на период исследований была равна 1,50 \$/кг. Исходя из этого, с учетом затрат комбикорма в процессе выращивания рыбы, достигнута экономия денежных средств за счет изменения стоимости прироста 1 кг рыбы в размере 0,52 \$ при использовании опытного комбикорма №3 (КО + 2% рапса + 3% сафлора + 3% хлореллы), 0,32 \$ – опытного комбикорма №2 (КС + 2% рапса + 3% сафлора) и 0,31 \$ – опытного комбикорма №1 (КС).

*Заключение.* Исследованиями установлено, что при кормлении клариевого сома кормами, содержащими жмыхи рапса, сафлора и суспензию хлореллы, и импортными кормами темп роста молоди рыб и рыбоводные показатели были схожими в контрольном и опытных вариантах. Наблюдалось некоторое увеличение абсолютного и относительного приростов с одновременным снижением кормового коэффициента при использовании экспериментального комбикорма №3 (КС + 3% рапса + 3% сафлора + 3% хлореллы), что позволило получить экономию денежных средств в размере 0,52 \$ на прирост 1 кг рыбы.

Таким образом, проведенные исследования по использованию разработанных отечественных комбикормов для молоди клариевого сома, содержащих суспензию хлореллы и жмыхи масличных культур, свидетельствовали о возможности замены ими импортных комбикормов. Это соответствует целям импортозамещения, позволит обеспечить рыбоводную отрасль качественными кормами и открывает перспективы эффективного производства ценных видов рыб.

#### Список использованных источников

1. Богданов, Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных / Н. И. Богданов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Пенза : Здоровье и экология, 2007. – 48 с.
2. Зиновьев, Е. А. Методы исследования пресноводных рыб : учеб. пособие / Е. А. Зиновьев, С. А. Мандрица ; М-во образования Рос. Федерации, Перм гос. ун-т. – Пермь : Перм. ун-т, 2003. – 115 с.
3. Иванов, А. А. Физиология рыб : учеб. пособие / А. А. Иванов. – Изд. 2-е, стер. – СПб. [и др.] : Лань, 2011. – 280 с.
4. Кузьмина, В. В. Процессы пищеварения у рыб. Новые факты и гипотезы / В. В. Кузьмина ; Ин-т биологии внутр. вод им. И. Д. Папанина РАН. – Ярославль: Филигрань, 2018. – 300 с.
5. Куницын, М. В. Хлорелла – будущее птицеводства / М. В. Куницын // Птицеводство. – 2009. – № 4. – С. 20.
6. Мухрамова, А. А. Исследование влияния кормов с биологически активными добавками на рост осетровых рыб при бассейновой технологии выращивания / А. А. Мухрамова, С. К. Койшибаева // Вестн. Казах. нац. ун-та. Сер. эколог. – 2012. – № 1 (33). – С. 106–108.
7. Отечественные продукционные комбикорма для форели / В. Н. Столович [и др.] // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сб. науч. тр. / Ин-т рыб. хоз-ва Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2005. – Вып. 21 / [редкол.: В. В. Кончиц (отв. ред.) и др.]. – С. 160–163.
8. Первые результаты применения стартового комбикорма для выращивания личинок африканского сома (*Clarias gariepinus*) / В. В. Приз [и др.] // Вопросы рыбного хозяйства Беларуси : сб. науч. тр. / Ин-т рыб. хоз-ва, Науч.-практ. центр Нац. акад. наук по животноводству, Белорус. гос. ун-т. – Минск, 2008. – Вып. 24 / [редкол.: М. М. Радько (гл. ред.) и др.]. – С. 183–186.

9. Петрухин, И. В. Корма и кормовые добавки : справочник / И. В. Петрухин. – М. : Росагропромиздат, 1989. – 526 с.
10. Пономаренко, Ю. А. Питательные и антипитательные вещества в кормах / Ю. А. Пономаренко ; М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь. – Минск : Экоперспектива, 2007. – 960 с.
11. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных) / И. Ф. Правдин ; под ред.: П. А. Дрягина, В. В. Покровского. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Пищ. пром-сть, 1966. – 376 с.
12. Серпунин, Г. Г. Биологические основы рыбоводства : практикум / Г. Г. Серпунин. – М. : Моркнига, 2015. – 155 с.
13. Скляр, В. Я. Кормление рыб : справочник / В. Я. Скляр, Е. А. Гамыгин, Л. П. Рыжков. – М. : Легк. и пищ. пром-сть, 1984. – 120 с.
14. Способ и продукт (варианты) переработки суспензии планктонных штаммов хлореллы, альголизированный комбикорм, способ его получения, способ введения продукта переработки в систему поения птиц или свиней : пат. 2538399 Российская Федерация : МПК А23К 1/00 (2006.01) / Куницын, М. В. ; дата публ.: 10.01.2015.
15. Уфимцев, Д. К. Использование суспензии микроводоросли штамма ИФР № С-111 в рационах молодняка свиней : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.02.02 / Д. К. Уфимцев ; Орлов. гос. аграр. ун-т. – М., 2009. – 24 с.
16. Фаритов, Т. А. Кормление рыб : учеб. пособие / Т. А. Фаритов. – СПб. : Лань, 2016. – 344 с. – (Учебники для вузов. Специальная Список использованных источников).
17. Щербина, М. А. Кормление рыб в пресноводной аквакультуре / М. А. Щербина, Е. А. Гамыгин. – М. : Изд-во ВНИРО, 2006. – 360 с.
18. Cultured Aquatic Species Information Programme (Clarias gariepinus) [Electronic resource] // Fisheries and Aquaculture Department (FAO). – Mode of access: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Clarias\\_gariepinus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Clarias_gariepinus/en). – Date of access: 24.10.2016.
19. Shields, R. J. Algae for Aquaculture and Animal Feeds / R. J. Shields, I. Lupatsch // Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis. – Heft 1. – 2012. – P. 23–37.
20. Tibbetts, S. M. The Potential for «Next-Generation», Microalgae-Based Feed Ingredients for Salmonid Aquaculture in Context of the Blue Revolution / S. M. Tibbetts // Microalgal Biotechnology – In Tech Open Publishing. – 2018. – P. 151–175.

УДК 574:582.251.62:615.322:633.8

## **ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА МАРГАНЦА НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК *CHLORELLA VULGARIS* ШТАММА С 111 ИВСЕ С-19**

**И.А. Ильючик, В.Н. Никандров**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

В последнее время почти во всех странах мира уделяют огромное внимание увеличению производства высокобелковых и витаминных продуктов, поиску богатых и дешевых источников белков и других питательных веществ [1]. Среди разнообразных организмов, которые рассматривают в качестве альтернативного источника белка, видное место занимают микроводоросли [2], в частности *Chlorella vulgaris*.

Хлорелла характеризуется вариабельностью физиолого-биохимических свойств и химического состава, зависящей от состава питательной среды, что позволяет осуществлять управляемый биосинтез ею ценных природных соединений [3]. Она является одним из перспективных возобновляемых ресурсов органического сырья [2], так как способна превращать 9–10% солнечной энергии в биомассу с теоретическим выходом около 280 т/га в год [4]. Дальнейшая интенсификация технологии культивирования хлореллы требует углубленного изучения механизмов регуляции метаболизма и жизнедеятельности ее клетки, а также введения в питательную среду эффекторов, стимулирующих процессы метаболизма.

Одним из таковых эффекторов может служить марганец – истинный биоэлемент, поступающий в клетки в форме ионов  $Mn^{2+}$  [5]. В растениях он необходим для фоторазложения воды. Быстро проникая в клетки, марганец способствует значительному увеличению интенсивности фотосинтеза, участвуя в окислении, существенно активизирует полный круг метаболических реакций [6].

Недостаток марганца у фотосинтезирующих микроорганизмов тормозит деление клеток, вызывая нарушение их физиологических функций, сопровождающееся нарушением в структуре хлоропластов. При его дефиците у хлореллы образуются необычно большие клетки неправильной формы, а на полностью освобожденной от марганца среде почти полностью прекращается рост водорослей [7].

Избыток марганца также опасен для растений. При его концентрации в сухой биомассе свыше 0,2–0,5 г/кг на листьях, стеблях, побегах появляются некротические коричневые пятна, нарушается соотношение Fe/Mn, вызывая депрессию нуклеинового обмена [8]. В основе состояния хлороза также лежат процессы нарушения enzymатических систем, катализирующих биосинтез пигментов фотосинтеза [9]. Токсичность марганца связывают с дисфункцией митохондрий и увеличением генерирования активных форм кислорода [10]. Известно, что в экстенсивной культуре хлорелла может длительно сохранять жизнеспособность при высоком содержании марганца в среде культивирования [7, 11].

В литературе крайне мало данных о влиянии  $Mn^{2+}$  в широком диапазоне концентраций на физиолого-биохимические процессы микроводорослей. В то же время информация об оптимальных концентрациях марганца в питательной среде крайне разнородна. Следует отметить, что и механизм биологического действия  $Mn^{2+}$  на физиолого-биохимические процессы в живых организмах еще далек от исчерпывающей ясности.

**Цель работы** – раскрыть особенности динамики накопления биомассы, белка и фотосинтетических пигментов в клетках зеленой микроводоросли *Ch. vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при добавлении  $MnCl_2$  в питательную среду в широком диапазоне концентраций.

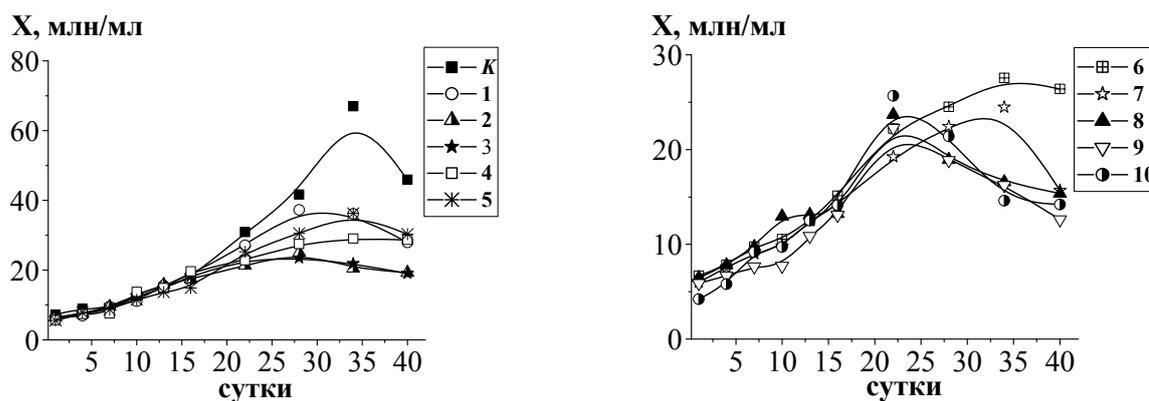
**Материалы и методы.** Исследования выполнены на альгологически чистой культуре *Chlorella vulgaris* биологического штамма С 111 ИВСЕ С-19 из коллекции РУП «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Микроводоросль выращивали на среде Тамия (концентрация  $MnCl_2$  0,50 мг/л) [12], которая являлась в условиях эксперимента контрольным вариантом. В остальные варианты вносили  $MnCl_2$  «хч» до конечной концентрации 0,010, 0,025, 0,050, 0,100, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 и 25,0 мг/л. В одном из вариантов соль  $MnCl_2$  отсутствовала – «нулевой».

Культивирование культуры, забор аликвот и определение концентрации общего белка (мкг/мл) проводили как подробно описано нами ранее [13]. Концентрацию исследуемых пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) (мг/л) в клетках хлореллы определяли по [14].

Исследования проведены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*), уровень значимости ( $P \leq 0,05$ ).

**Результаты.** В течение 40 сут культивирования в контрольном варианте уровень биомассы линейно нарастал в период с 1–34-х сут, увеличение достигло 9,2 раза (рисунок 1).



**Рисунок 1.** – Динамика накопления биомассы культурой хлореллы при добавлении в питательную среду  $MnCl_2$  (мг/л): *K* – контроль (среда Тамия); 1 - 0; 2 - 0,010; 3 - 0,025; 4 - 0,050; 5 - 0,100; 6 - 1,000; 7 - 2,500; 8 - 5,000; 9 - 10,000; 10 - 25,000

В отсутствие  $MnCl_2$  в питательной среде на протяжении всего культивирования (за исключением 7, 13, 16-х сут) рост культуры угнетался на 10,0–46,1% (рисунок 1).

По сравнению со средой Тамия во всех опытных вариантах с  $MnCl_2$  в среде, снижалось накопление биомассы на протяжении всего периода культивирования. Особенно заметно это было в периоды 1–4-е сут (на 11,1–42,2%) и 22–40-е сут (на 16,9–78,2%). В период 7–16-е сут наблюдался небольшой рост биомассы при концентрациях  $MnCl_2$  в среде 0,01–0,05 мг/л (на 12%). При других концентрациях  $Mn^{2+}$  в среде рост хлореллы угнетался, особенно при трех максимальных концентрациях эффектора (на 11,9–37,4%) (рисунок 1).

В контрольном варианте в период 1–10-е сут содержание белка в клетках хлореллы снижалось на 12,7%. К 16-м сут уровень его возрос в 2,3 раза (максимальный за весь период культивирования). Затем к 22-м суткам он падал на 34,8%, и к 34-м сут возрастал в 2,6 раза. Дальнейшего роста уровня внутриклеточного белка не наблюдалось (рисунок 2).

В культуральной жидкости содержание белка в контроле в период 1–7-е сут возросло в 2,6 раза и было максимальным за весь период культивирования. К 10-м сут уровень его снижался на 14,2%, после чего наблюдалось резкое падение его уровня в 44,9 раза (22-е сут), а на 34-е сут белок вовсе не обнаружили, хотя к 40-м сут он вновь накапливался (рисунок 2).

В «нулевом» варианте, а также при концентрации хлорида марганца в питательной среде 0,010, 0,025, 2,50–10,00 мг/л на 13-е сут роста культуры уровень белка в клетках хлореллы был ниже контроля на 14–31%, а при концентрации 0,1–1,0 мг/л превышал его на 17,5–50,1%. При максимальной концентрации эффектора этот показатель практически не отличался от такового в контроле. На 16, 22 и 40-е сут почти во всем диапазоне концентраций эффектора уровень белка в клетках превышал таковой в контроле на 19–46, 40–144 и 10–49,7% соответственно (рисунок 2).

В среде, не содержащей соли марганца, можно выделить следующие изменения концентрации внутриклеточного белка: на 22-е сут – рост на 45%, на 34-е сут – спад на 38,6%; изменения содержания белка в культуральной жидкости на 10, 22 и 40-е сутки – уменьшение на 59,5%, рост на 520,5%, спад на 16,7% соответственно, в сравнении с контролем (рисунок 2).

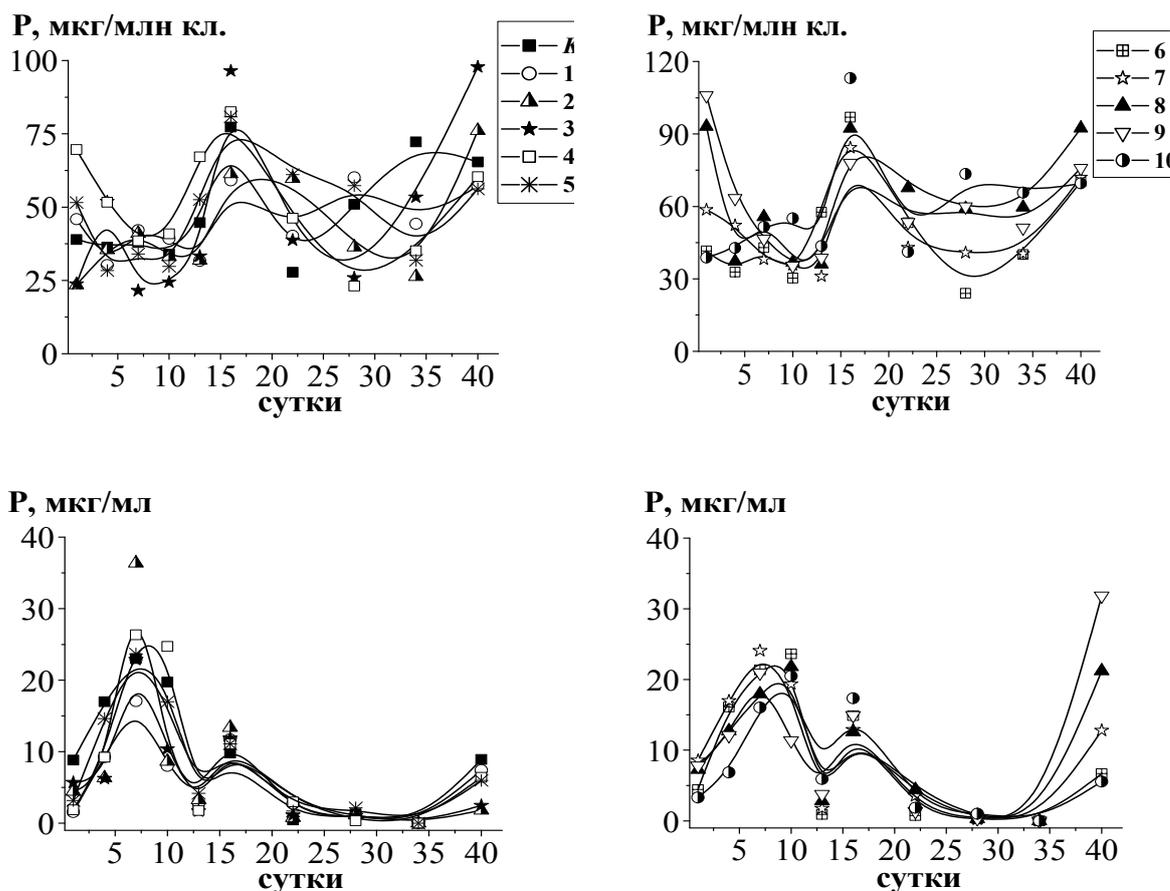


Рисунок 2. – Динамика накопления внутриклеточного белка хлореллой (А) и белка в культуральной жидкости (Б) при добавлении в питательную среду  $MnCl_2$  (мг/л): К – контроль (среда Тамия); 1 - 0; 2 - 0,010; 3 - 0,025; 4 - 0,050; 5 - 0,100; 6 - 1,000; 7 - 2,500; 8 - 5,000; 9 - 10,000; 10 - 25,000

В сравнении с контролем при всех концентрациях  $MnCl_2$  в питательной среде в период 1–10-е сут, а также на 28-е и 40-е сут наблюдали снижение уровня белка в культуральной жидкости на 13,8–83,9%. Исключением были 7-е сут, когда при концентрации эффектора 0,01 и 0,05 мг/л выявлен рост уровня белка на 58,0 и 14,6% соответственно. Подобную картину отметили и на 10-е сут: при концентрации соли 0,05, 1,00 и 5,00 мг/л уровень белка возрос на 25,1, 19,7 и 10,4% соответственно, а также на 28-е сут: при концентрации соли 0,1, 2,5, 5,0 и 10,0 мг/л рост его уровня составил 64,9, 43,7, 138,3 и 257,9% соответственно. В период 13–22-е сут выявлено увеличение уровня белка в культуральной жидкости на 13,7–900%, за исключением 13-х суток при концентрации эффектора 0,025, 0,050, 1,000 и 2,500 мг/л (снижение на 31,5, 28,6, 63,3 и 30,2% соответственно в сравнении с контролем) (рисунок 2).

При оценке общей продуктивности биомассы было сопоставлено накопления белка в ней с количеством клеток. По данному показателю предпочтительной оказалась среда Тамия ( $MnCl_2$  0,50 мг/л). Так, через 34-е и 40-ок сут концентрация внутриклеточного белка в данном варианте достигала 4,84 и 3,00 мг/мл соответственно.

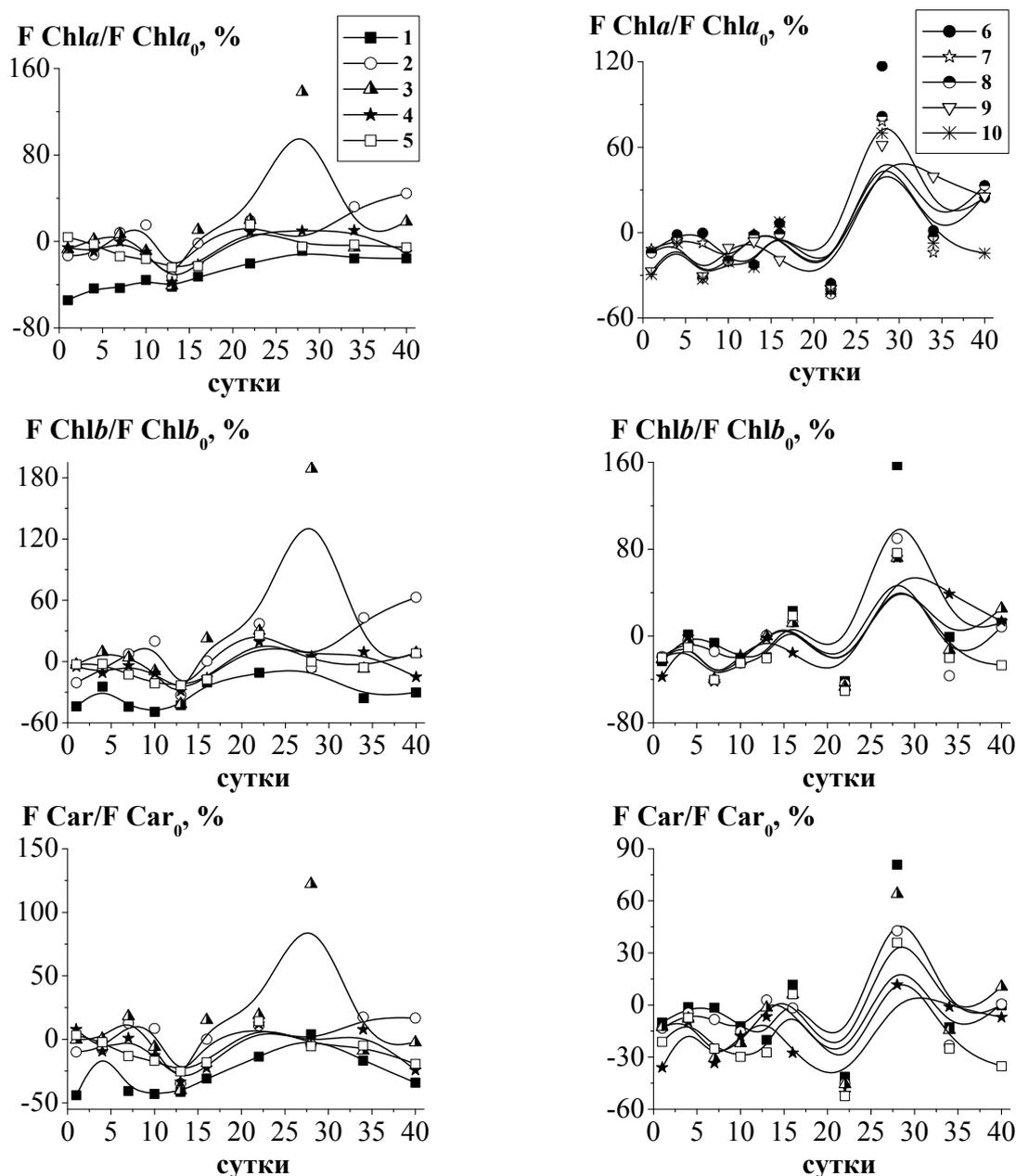


Рисунок 3. – Изменения (% к контролю – среда Тамия, принятому за 100%) уровня хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в клетках хлореллы при добавлении в питательную среду  $MnCl_2$  (мг/л): 1 – 0; 2 – 0,010; 3 – 0,025; 4 – 0,050; 5 – 0,100; 6 – 1,000; 7 – 2,500; 8 – 5,000; 9 – 10,000; 10 – 25,000

Величина отношения содержания белка клетки/культуральная жидкость в контрольном варианте в начале культивирования уменьшалась с 4,42 до 1,72 к 10-м сут. Она резко увеличивалась к 13-м сут до 18,04 и к 28-м суткам до 39,16, снижаясь до 7,34 в конце культивирования. При добавлении  $MnCl_2$  в питательную среду изменения данного отношения носили сложный характер в зависимости от концентрации эффектора и времени культивирования.

За весь период культивирования концентрации хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в контрольном варианте возросли в 1,7 раза и их изменения были однотипны (рисунок 3).

Динамика уровня хлорофилла *a* в контрольном варианте в период 1–22-е сут, приближалась к линейной зависимости, что согласуется с линейной динамикой накопления биомассы культурой. Однако, через 28 сут его концентрация падала в контроле на 44%, вновь возрастала в последующий период культивирования, достигая максимума в конце культивирования, и увеличиваясь в 1,7 раза по сравнению с 28-ми сут.

В период 1–7-е сут роста культуры концентрация хлорофилла *a* в клетках контрольного варианта возросла на 75%. К 10-м суткам его уровень снизился на 25%, а с 13-х до 22-х сут наблюдался рост его концентрации на 31% в сравнении с 10-ми сут. На 28-е сут уровень пигмента вновь падал на 44% в сравнении с 22-и сут, однако к концу культивирования практически не отличался от такового 22-х сут (рисунок 3).

Следует также отметить, что при всех концентрациях  $MnCl_2$  в среде культивирования *Ch. vulgaris*, в период 1–22 сут уровень фотосинтетических пигментов был, за редким исключением, ниже в сравнении с контролем. На 22-е сут при концентрации  $MnCl_2$  0,01–0,10 мг/л уровень хлорофилла *a* возрос на 9–20, хлорофилла *b* на 19–37, каротиноидов на 11–19% соответственно. При концентрации соли 1,0–25,0 мг/л наблюдалось максимальное снижение их содержания: хлорофилла *a* на 36–43, хлорофилла *b* на 42–51, каротиноидов на 41–52% соответственно в сравнении с контролем.

На 28-е сут картина существенно менялась. В сравнении с контролем при концентрации эффектора 0,01–0,10 мг/л, уровень хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов снизился, кроме варианта 0,025 мг/л, в котором наблюдали увеличение на 138, 188 и 122% соответственно. При концентрациях  $MnCl_2$  1,00–25,00 мг/л в данный период культивирования выявлен рост уровня хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов на 62–82, 72–157 и 12–81% соответственно. В последующие периоды (34, 40-е сут) также наблюдали колебания уровня фотосинтетических пигментов относительно контрольного варианта, но они не были столь велики (рисунок 3).

**Заключение.** Изложенные выше результаты свидетельствуют о том, что исключение из питательной среды хлорида марганца негативно сказывается на росте культуры хлореллы. Снижение или увеличение концентрации эффектора в среде Тамия не способствуют накоплению биомассы *Ch. vulgaris*, поэтому оптимальной концентрацией  $MnCl_2$  в среде культивирования явилась – 0,50 мг/л (среда Тамия), время роста – 34-е сутки. Добавление  $MnCl_2$  во всех исследуемых концентрациях, тем не менее, не вызывало угнетение роста и гибели культуры. Следует также заметить, что марганец играет важную роль в фиксации  $CO_2$ , фосфорно-энергетическом обмене и устранении супероксидных радикалов. Можно думать, что при изменениях уровня фосфатов и азотистых соединений в питательной среде, оптимальным будет иная концентрация  $Mn^{2+}$ . Для этого необходимы дальнейшие исследования.

Судя по полученным материалам, что культура хлореллы в процессе развития проходит несколько функционально-метаболические перестроек, носящих колебательный характер, а добавление  $MnCl_2$  в питательную среду в зависимости от концентрации способно изменять их характер. Уровни сдвигов концентраций фотосинтетических пигментов практически совпадают со сдвигами концентрации внутриклеточного белка. Выяснение причин функционально-метаболических перестроек в культуре микроводоросли хлореллы составляет задачу наших дальнейших исследований.

#### Список использованных источников

1. Люндышев, В.А. Технологии производства продукции животноводства / В.А. Люндышев. – Минск, 2018. – 292 с.
2. Single cell protein production: A review / G. Suman [et al.] // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – Vol. 4, № 9. – P. 251–262.
3. Оптимизация условий выращивания хлореллы / С.С. Мельников [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2014. – № 3. – С. 52–56.

4. Khan, M.I. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products / M.I. Khan, J.H. Shin, J.D. Kim // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – Vol. 17. – P. 1–21.
5. Fisher, W.W. Manganese and the evolution of photosynthesis / W.W. Fisher, J. Cannabis, J.E. Johnson // *Orig Life Evol Biosph*. – 2015. – Vol. 45, iss. 3. – P. 351–357.
6. Белоус, О.Г. Влияние микроэлементов на интенсивность фотосинтеза растений чая в зоне влажных субтропиков России / О.Г. Белоус // *Современные проблемы науки и образования*. – 2011. – № 5.
7. Упитис, В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В.В. Упитис. – Рига, 1983. – 240 с.
8. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water / S. Krishna [et al.] // *Arch Toxicol*. – 2014. – Vol. 88, iss. 1. – P. 47–64.
9. Manganese toxicity in sugarcane plantlets grown on acidic soil of Southern China / Y.L. Huang [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, iss. 3. – P. e0148956.
10. Manganese ions enhance mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission from Krebs cycle oxidoreductases by inducing permeability transition / E. Bonke [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. – 2016. – Vol. 99. – P. 43–53.
11. Лукьянов, В.А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В.А. Лукьянов, А.И. Стифеев. – Курск, 2014. – 181 с.
12. Влияние сульфата никеля на урожай биомассы и содержание белка в клетках *Chlorella vulgaris* в динамике роста культуры / И.А. Ильючик [и др.] // *Вестн. Палескага дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук*. – 2020. – № 2. – С. 32–39.
13. Ильючик, И.А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении MnCl<sub>2</sub> в питательную среду / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Вестн. Палескага дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук*. – 2018. – №1. – С. 53–64.
14. Ильючик, И.А. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // *Вестні Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 299–309.

УДК 574.24:595.773.4

#### АНАЛИЗ РОСТРЕГУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОНЬЮГАТОВ ЭПИКАСТЕРОНА С ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ НА ПРИМЕРЕ ГРЕЧИХИ ПОСЕВНОЙ (*FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH.)

С.Э. Кароза

*Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина, Брест, Беларусь*  
karoza01@ya.ru

Эпикастерон является одним из соединений, относящихся к группе brassinosteroidов, которые представляют собой особый класс растительных фитогормонов, встречающихся в растениях повсеместно. Эта группа включает большое количество (более 70) соединений, которые демонстрируют структурное сходство со стероидными гормонами насекомых, животных и человека. Молекулярно-генетический анализ мутантов, дефектных в отношении биосинтеза brassinosteroidов, показал, что они необходимы для нормального роста и развития растений. Эти данные, наряду с широким распространением этих соединений в растениях и их высокоэффективным действием, привели к признанию brassinosteroidов в качестве нового класса растительных гормонов [1]. Исследования их влияния на живые организмы описаны в многочисленных публикациях, особенно зарубежных, но наиболее полная русскоязычная обзорная монография опубликована сотрудниками ИБОХ НАН РБ [2]. В БрГУ имени А. С. Пушкина в ходе выполнения исследований в рамках задания ГПНИ в 2016–2020 гг. проводилась оценка действия brassinosteroidов на рост, развитие и биохимические показатели многих сельскохозяйственных культур, в результате которых были определены наиболее перспективные для применения в растениеводстве препараты [3]. Но в Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь, в настоящее время из brassinosteroidов включены всего два препарата, относящихся к большой группе регуляторов роста растений, – эпин и эпин плюс, в качестве действующего вещества содержащие, соответственно, эпибрасинолид и

гомобрассинолид [4]. Их применение, особенно препарата на основе гомобрассинолида, регламентировано для сравнительно небольшого спектра культур. Поэтому продолжение исследований по изучению действия БС и их производных на живые организмы остается актуальным как с теоретической, так и с практической точки зрения. К таким производным относятся и конъюгаты брассиностероидов с различными органическими кислотами, которые сами также обладают определенной биологической активностью, а некоторые, например, индолилуксусная кислота, сами являются гормонами.

В качестве тест-объекта нами была выбрана гречиха посевная, так как она является очень популярной крупяной культурой, особенно на территории стран бывшего СССР, благодаря своей высокой питательной ценности и удобству в приготовлении. Крупа содержит различные белки, которые хорошо сбалансированы по аминокислотному составу и содержат многие незаменимые аминокислоты. По составу аминокислот они близки к белкам сухого молока и куриных яиц. Основная их часть относится к легкорастворимой альбуминовой и глобулиновой фракции и поэтому легко усваивается человеком. Углеводы в основном представлены крахмалом. Для липидов гречневой крупы характерны низкие йодное и окислительное числа, а также высокое содержание ненасыщенных линолевой и линоленовой кислот. В ней содержится много витамина Е, который является антиоксидантом. Поэтому гречневая крупа долго хранится без потери качества, что очень важно при создании стабилизационных резервов продовольствия [5]. Из гречневой крупы и соломы выделены многие витамины: рутин, ниацин, рибофлавин и фолиевая кислота. Гречиха содержит много железа, меди, кобальта, марганца и других микроэлементов [6]. Она является также общепризнанным хорошим медоносом.

Но, несмотря на все выявленные достоинства, в Республике Беларусь посевные площади под эту культуру постоянно сокращались, и только в последние годы в связи с ажиотажным спросом ситуация немного улучшилась. Так, в 2014–2015 гг. гречиха высевалась на площади 14–20 тыс. га, хотя в 60-х гг. XX в. ее посевы занимали площадь более 300 тыс. га, в 70–80-х гг. – 100 тыс. га, в начале XXI в. (2003–2012 гг.) – от 8 до 44 тыс. га [7]. Одна из причин этого явления – невысокая урожайность гречихи, которая, по данным ЦСУ, не превышает 11,6 ц/га, хотя эта культура обладает гораздо более высоким потенциалом [8]. Низкая продуктивность объясняется многими причинами, в том числе теплолюбивостью и слабым развитием корневой системы этой культуры, что обуславливает ее сильную зависимость от погодных условий. Поэтому белорусские производители не всегда могут конкурировать с зарубежными, где климатические условия более благоприятны. Обеспечить большую стабильность роста и развития гречихи можно различными агротехническими мероприятиями. Сейчас актуально направление, основанное на стимуляции роста, иммунитета и урожайности растений с помощью экологически безопасных биологически активных веществ, к которым относятся и брассиностероиды, положительное влияние которых на гречиху уже было показано нами ранее [9]. Перспективным направлением изменения растворимости и повышения их биологической активности является модификация структуры молекул путем конъюгации с органическими кислотами. Такие конъюгаты были синтезированы, в том числе сотрудниками ИБОХ НАН РБ, но в доступных источниках данных о их влиянии на рост и развитие гречихи посевной нами обнаружено не было.

Первичной целью наших скрининговых исследований являлась оценка влияния эпикастерона и его конъюгатов с кислотами на показатели роста и развития гречихи посевной в лабораторных условиях. Для этого использовали растворы трех стероидных соединений (24-эпикастерон (ЭК), 2-моно-салицилат 24-эпикастерона (S23) и тетра-индолилацетат 24-эпикастерона (S31)) в концентрациях от  $10^{-7}$  до  $10^{-11}$  М. Оценивали показатели всхожести и энергии прорастания семян, а также влияние этих препаратов на морфометрические показатели развития гречихи при ее проращивании рулонным методом [10]. В качестве объекта исследования использовали семена районированного в Республике Беларусь детерминантного диплоидного сорта Влада прямостоячего типа. Средняя урожайность зерна – 16,5, а максимальная – 28,1 ц/га. Вегетационный период в среднем 83 дня. Технологические и крупяные качества хорошие. Масса 1000 семян в среднем 29,5 г. Характерен выровненный стеблестой, хорошее ветвление, дружное цветение и плодообразование. Обработку семян производили методом замачивания в растворах стероидов в течении 5 часов. Статистическую обработку осуществляли стандартными методами с использованием программы Microsoft Excel [11].

Анализ результатов показал, что исследуемые стероиды оказали неоднозначное влияние на энергию прорастания, всхожесть, длину корешков и высоту проростков гречихи в зависимости от используемой концентрации. Энергия прорастания в контроле составляла около 62 %, все три

вещества в концентрации  $10^{-7}$  М незначительно снижали ее примерно до 60 %, растворы в концентрации  $10^{-11}$  М или не оказывали влияния, или незначительно понижали этот показатель. Значимо повышали энергию прорастания растворы в среднем диапазоне концентраций, но для разных препаратов максимум наблюдался при разных концентрациях: для ЭК –  $10^{-9}$ , для S23 –  $10^{-8}$ , а для S31 – растворы с концентрациями  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М оказывали практически одинаковое влияние, но более слабое, чем у двух вышеуказанных препаратов, где ее значение достигало 71 %, то есть почти на 10 % выше контроля с замачиванием в воде. Влияние на всхожесть было сходным, но менее выраженным, что вполне закономерно, так как этот показатель более стабилен по сравнению с энергией прорастания. Максимально повышало его значение использование растворов ЭК в концентрации  $10^{-9}$ , S23 –  $10^{-8}$ , а их обработка раствором S31 с концентрациями  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М приводила к близким результатам. Растворы всех трех препаратов в концентрации  $10^{-7}$  М вызывали отрицательный эффект, но понижали всхожесть не более чем на 1,5 %. Сравнительный анализ двух показателей показал, что энергию прорастания максимально повышало применение ЭК в концентрациях  $10^{-10}$  и  $10^{-9}$  М (на 13,0 и 15,4 % соответственно, а использование его конъюгатов дало менее выраженный эффект: для S23 максимальное повышение составило 13,6 % (концентрация  $10^{-8}$  М), а для S31 – 11,3 % (концентрация  $10^{-9}$  М) (рисунок 1). На всхожесть максимальное положительное влияние ЭК оказал при использовании раствора с концентрацией  $10^{-9}$  М, а S23 и S31 –  $10^{-8}$  М.



**Рисунок 1 – Влияние эпикастастерона и его конъюгатов на морфометрические параметры гречихи посевной, % к контролю: –11, –10, –9, –8, –7 – молярные концентрации ЭК, S23 и S31**

Анализ влияния препаратов на высоту побегов показал, что использование раствора ЭК приводило к повышению этого показателя во всех концентрациях, кроме максимальной (рисунок 2). Максимальное влияние оказал раствор в концентрации  $10^{-9}$  и  $10^{-10}$  М, увеличивший значения на 56,3 и 51,3 % соответственно. Влияние S23 отличалось: растворы в концентрациях  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  и  $10^{-7}$  М ингибировали рост побегов (на 5,9, 5,8 и 19,1 % соответственно), а  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М – стимулировали, но слабее, чем в варианте с ЭК (на 6,0 и 8,9 % соответственно). При использовании раствора S31 влияние было сходно с действием ЭК, но было выражено в меньшей степени: значение показателя увеличивалось во всех вариантах, при использовании всех концентраций, но наиболее сильно при использовании концентраций  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М (на 37,5, 23,4, и 21,0 % соответственно).

Влияние растворов на длину корней существенно отличалось от влияния на высоту побегов: две минимальные концентрации ( $10^{-11}$  и  $10^{-10}$  М) вызывали или уменьшение этого показателя, или не влияли на него (рисунок 2). Замачивание семян в растворе ЭК вызывало снижение исследуемого показателя в трех минимальных концентрациях:  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  и  $10^{-9}$  М (на 6,9, 5,3 и 1,6 % соответственно). При использовании раствора ЭК в концентрации  $10^{-8}$  М длина увеличивалась на 17,9 % по сравнению с контролем. Влияние растворов S23 на длину корней было отрицательным в трех вариантах:  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  и  $10^{-7}$  М (снижение по сравнению с контролем на

5,9, 4,8 и 9 %). В вариантах с концентрациями 10–9 и 10–8 М происходило повышение данного показателя на 16,9 и 23,7 % соответственно. Применение S31 дало отрицательный эффект в минимальной концентрации с уменьшением длины корней на 4,2 %. В остальных вариантах происходило увеличение длины корней, но значимым оно было только при использовании растворов в концентрациях 10–9 и 10–8 М (плюс 8,2 и 15,5 % к контролю).



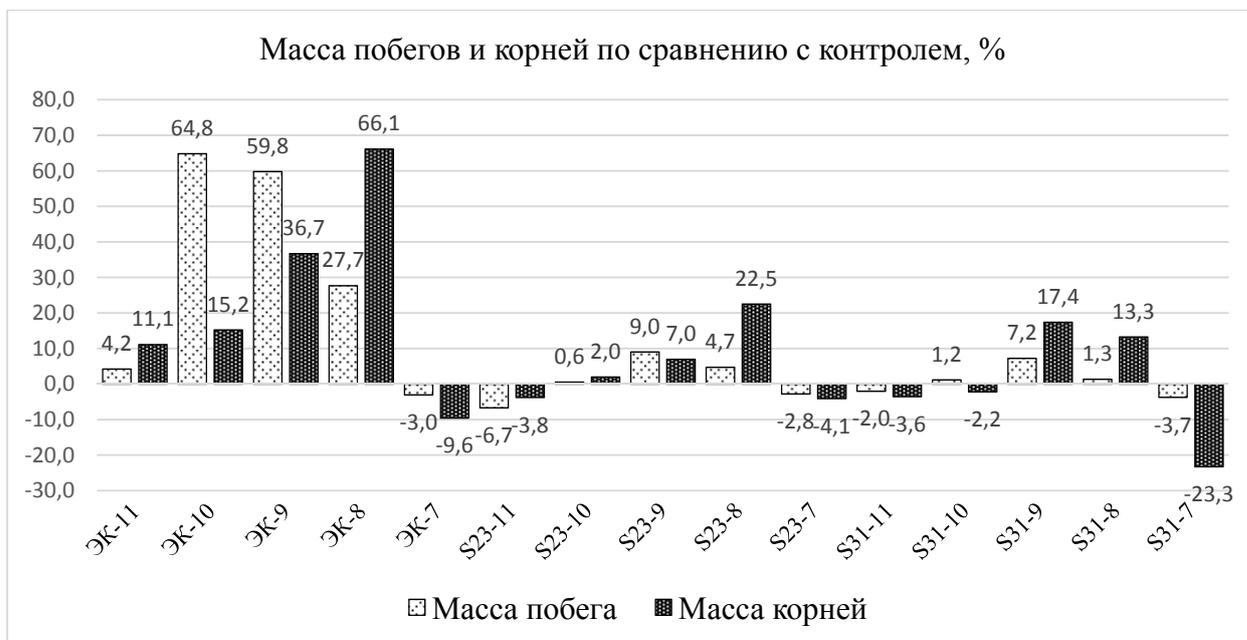
**Рисунок 2. – Влияние эпикастестерона и его конъюгатов на морфометрические параметры гречихи посевной, % к контролю: –11, –10, –9, –8, –7 – молярные концентрации ЭК, S23 и S31**

Для оценки влияния исследуемых соединений на массу побегов и корней их взвешивали по 10 штук, так как предыдущие исследования, проведенные нами на гречихе, показали, что один побег или корневая система имеют очень малую массу, что значительно увеличивает погрешность измерений при округлении данных. Результаты анализа показали, что влияние препаратов на высоту и массу побегов было не полностью идентичным.

Действие самого эпикастестерона приводило к значительному повышению исследуемого показателя по сравнению с контролем в трех концентрациях:  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М (на 64,8, 59,8 и 27,7 % соответственно). Раствор в максимальной используемой концентрации уменьшал массу побегов, но очень незначительно – всего на 3 % (рисунок 3). Применение для замачивания семян раствора S23 также вызывало увеличение массы побегов в трех концентрациях:  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М, но по сравнению с контролем оно также было незначительным (на 0,6 и 9,0 и 4,7 % соответственно).

Растворы S23 в концентрациях 10–11 и 10–7 М ингибировали рост побегов (на 6,7 и 2,8 % соответственно). Влияние на данный показатель третьего препарата S31 вообще было выражено очень слабо. Минимальная и максимальная используемые концентрации незначительно уменьшали этот показатель по сравнению с контролем (на 2,0 и 3,7 % соответственно), при действии растворов с концентрациями 10–10 и 10–8 М разница составляла всего около 1 %, и только раствор в концентрации 10–9 М увеличивал массу проростков на 7,2 %.

Влияние стероидных препаратов на массу корней также не полностью соответствовало их действию на длину корешков. Действие самого эпикастестерона приводило к плавному и постепенному повышению исследуемого показателя по сравнению с контролем в четырех концентрациях, начиная с минимальной: 10–11, 10–10, 10–9 и 10–8 М (на 11,1, 15,2, 36,7 и 66,1 % соответственно). Раствор в самой максимальной концентрации уменьшал массу корней на 9,6 % (рисунок 3). Применение для обработки раствора S23 также вызывало увеличение этого показателя по сравнению с контролем в трех концентрациях: 10–10, 10–9 и 10–8 М (на 2,0, 7,0 и 22,5 % соответственно). Растворы в самой минимальной и максимальной концентрациях незначительно ингибировали массу корней (на 3,8 и 4,1 % соответственно).



**Рисунок 3. – Влияние эпикастестерона и его конъюгатов на массу побегов и корней гречихи посевной, % к контролю: –11, –10, –9, –8, –7 – молярные концентрации ЭК, S23 и S31**

Положительное влияние на данный показатель S31 наблюдалось только в двух концентрациях:  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М (на 17,4 и 13,3 % соответственно). Две минимальные используемые нами концентрации уменьшали массу корешков по сравнению с контролем примерно на 2 %. Раствор в максимальной концентрации достаточно сильно уменьшил массу корневой системы (на 23,3 %), хотя длину корней он незначительно увеличивал.

Проведенные исследования позволили прийти к следующему заключению: практически по всем показателям (энергия прорастания, всхожесть, длина и масса побегов и корней) максимальные стимулирующие свойства проявил брассиностероид эпикастестерон, а его конъюгаты в данном спектре концентраций действовали слабее, хотя общая закономерность в целом сохранялась. Растворы в минимальной исследованной концентрации ( $10^{-11}$  М) не давали значимого эффекта или незначительно уменьшали показатели, а в максимальной концентрации ( $10^{-7}$  М) оказывали достаточно сильное ингибирующее влияние на рост гречихи посевной сорта Влада. Таким образом, для продолжения исследований с использованием почвогрунта можно ограничиться тремя концентрациями всех трех препаратов:  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М.

#### Список использованных источников

1. Дерфлинг, К. Н. Гормоны растений / К. Н. Дерфлинг. – М. : Наука, 1989. – 351 с.
2. Хрипач, В. А. Брассиностероиды / В. А. Хрипач, Ф. А. Лахвич, В. Н. Жабинский. – Минск : Наука и техника, 1993. – 287 с.
3. Биологическая активность брассиностероидов и стероидных гликозидов / С. Э. Кароза [и др.] ; под общ. ред. С.Э. Карозы ; Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина. – Брест : БрГУ, 2020 – 260 с.
4. Государственный реестр средств защиты растений (пестицидов) и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь / Л. В. Плешко [и др.]. – Минск : Земледелие и защита растений, 2014. – 628 с.
5. Кротов, А. Гречиха – *Fagopyrum* Mill. / А. Кротов // Культурная флора СССР. Кру-пяные культуры / А. Кротов ; под ред. П. М. Жуковского. – Ленинград : Колос, 1975. – С. 7–118.
6. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, Е. Л. Дмитрук. – Новосибирск : Наука, 1990. – 330 с.
7. Посевные площади основных сельскохозяйственных культур [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: [http://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/realny-sector-ekonomiki/selskoe-hozyaistvo/osnovnye-pokazateli-za-period-s-\\_po-\\_gody\\_6/valovoi-sbor-osnovnyh-selskoe-hozyaistvennyh-kultur/](http://www.belstat.gov.by/ofitsialnaya-statistika/realny-sector-ekonomiki/selskoe-hozyaistvo/osnovnye-pokazateli-za-period-s-_po-_gody_6/valovoi-sbor-osnovnyh-selskoe-hozyaistvennyh-kultur/). – Дата доступа: 10.03.2021.
8. Нехаев, А. А. Высокие урожаи гречихи – каждый год / А. А. Нехаев, А. Н. Анохин. – Минск : Ураджай, 1988. – 39 с.

9. Кароза, С. Э. Влияние брассиностероидов на морфометрические показатели гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench.) в лабораторных и полевых условиях (Брестская область) / С. Э. Кароза // Весн. Брэсц. Ўн-та. Сер. 5, Хімія. Біялогія. Навукі аб зямлі. – 2018. – № 2. – С. 38–44.

10. Семена зерновых культур. Сортовые и посевные качества. Технические условия: СТБ 1073–97. – Введ. 01.10.97. – Мн., 1986. – 18 с.

11. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Минск : Ураджай, 1973. – 320 с.

УДК 639.3.04, 639.312

## ПРОДУЦЕНТЫ ЗЕЛЬВЕНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Т.В. Козлова<sup>1</sup>, Н.А. Кузнецов<sup>1</sup>, А.И. Козлов<sup>1</sup>, Н.П. Дмитривич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

*nsx.kuznecov@gmail.com*

Южные и западные районы Беларуси имеют множество природных и искусственных водоемов, имеющих благоприятные гидрологические и гидробиологические условия для жизнедеятельности различных видов ихтиофауны. Характерной особенностью сложившихся в настоящее время ихтиокомплексов естественных водоемов Беларуси является высокая численность малоценных и низкая – ценных промысловых видов рыб. Основу (до 80 %) промысловых уловов озерно-речной рыбы последние годы составляют малоценные виды рыб (плотва, окунь, густера, ерш), тогда как вылов ценных видов (щука, лещ, судак, угорь др.) редко превышает 20 % от общей величины вылова. Среди малоценных видов рыб преобладает плотва (более 50 %), среди ценных – щука и лещ (60–70 %). Другие ценные промысловые виды вылавливаются в очень незначительном количестве.

Основной лов рыб ведется на озерах – 74,2 % от общего улова; из рек вылавливается 17,2 %, из водохранилищ – 8,6 %. При этом средняя рыбопродуктивность водохранилищ составляет 10–15 кг/га.

В Беларуси существует большое количество водохранилищ для их комплексного использования. При этом для рыборазведения такие водоемы задействованы недостаточно. Из общей площади водохранилищ страны (799,4 км<sup>2</sup>) 76% составляют малые водоемы [11]. Такие водоемы вполне пригодны для нагула товарной рыбы, причем их рыбопродуктивность может составлять до 2 ц/га, что позволяет снизить себестоимость продукции на 50% по сравнению с традиционным рыбоводством.

Зельвенское водохранилище является водохранилищем реки Неман, 18-тым по размеру зеркала водоемом страны, самым крупным из 608 в Гродненской области. Оно расположено от юго-востоку от городского поселка Зельва и находится частично в его границах. Водоем создан в 1983 году с целью орошения земель, водоснабжения и рыборазведения. Площадь водохранилища составляет 1190 га. В 2006 году на нем оборудована гидроэлектростанция. Размеры водохранилища 9х2 км. Площадь водного зеркала, меняется в зависимости от сезона. Максимальная глубина у плотины составляет 7,5 м средняя – 2,6 м. Объем воды составляет 0,028 км<sup>3</sup>. Длина береговой линии равняется 26,9 км.

Ихтиофауна Зельвенского водохранилища представлена обычным комплексом рыб, свойственным водоемам Беларуси. В водоёме встречаются щука, окунь, лещ, серебряный и золотой караси, ерш, красноперка. Из зарыбляемых видов – карп, белый амур, белый и пестрый толстолобики.

Известно, что основу кормовой базы рыб образует органическое вещество, создаваемое продуцентами. Следовательно, рыбопродуктивность должна быть выше там, где процесс первичного продуцирования идет интенсивнее. Но не вся произведенная первичная продукция непосредственно трансформируется в биомассу рыб. Зачастую, синезеленые водоросли, вызывающие «цветение» воды, не потребляются консументами, особенно если «цветение» вызвано такими видами как *Aphanizomenon flos-aquae* и *Anabaena flos-aquae*, имеющими достаточно крупные колонии и выделяющие в воду токсические вещества для организмов второго трофического уровня.

**Цель исследования.** Целью настоящих исследований являлось определение степени зарастаемости высшей водной растительностью, доминирующих видов в ее составе и определение локальных зон «цветения» воды в Зельвенском водохранилище.

**Материалы и методы.** Объектом исследований являлись высшая водная растительность, произрастающая вдоль береговой линии в прибрежной зоне водохранилища в июле–августе 2021 года и локальные области акватории где регистрировалось «цветение» воды, определяли видовой состав водорослей, вызывающих «цветение». Вся длина береговой линии была разделена на 7 станций. Длина станций составляла от 700 до 1500 м.

Гидрохимический режим соответствовал рыболовным нормам выращивания рыб по пастбищной технологии [1, 4]. Во время исследований температура воды колебалась в пределах 19–23°C. Концентрация растворенного в воде кислорода – в пределах от 4,0 до 6,7 мг/л. Амплитуда колебаний водородного показателя (рН) – от 7,0 до 7,7. Показатель аммиак/аммоний (NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub>, мг/л) регистрировался в пределах 0,04 до 0,56. Значения нитратов (NO<sub>3</sub>, мг/л) колебались в пределах 0,0–6,0 мг/л. Показатель нитритов (NO<sub>2</sub>, мг/л) находился в пределах 0,3–0,5. Железо общее имело показатель 0,2–0,7 мг/л.

Для установления видового состава доминирующих макрофитов растения брали целиком. Определяли свежесорванные растения. Количественное определение зарослей велось при помощи площадок размером 1 м<sup>2</sup> [9]. Все растения с площадки просчитывались, измерялась их длина и процентное содержание каждого вида. Видовой состав водорослей, вызывающих «цветение» воды и их численность определяли, используя камеру Нажотта. А виды высшей водной растительности и доминирующие виды сине-зеленых, вызывающие «цветение» воды определяли по А.Н. Липину [8].

**Результаты.** Зарастаемость водоемов водной растительностью тесно связана с физико-химическими и биологическими процессами, протекающими в них. Заросли водной растительности являются зоной обитания для многих беспозвоночных, а также субстратом для размножения стрекоз, жуков, моллюсков и рыб. Отмирая, водная растительность разлагается и минерализуется. Минеральные вещества вновь поступают в воду и включаются в круговорот веществ. Излишняя зарастаемость водоема отрицательно влияет на доступность кормов для рыб. Например, для укрытия растительных рыб, развития кормовых организмов, обитающих на растениях, достаточно 10–15 % зарастаемости макрофитами.

Для борьбы с зарастаемостью можно использовать 2 способа: биологический и механический. Все растения целесообразно уничтожать до начала цветения или созревания семян. Тростник, камыш, рогоз и другие растения необходимо срезать как можно ближе к грунту. Это гарантирует почти полное уничтожение зарослей.

Механические и химические методы, применяемые в борьбе с зарастаемостью, малоэффективны и дороги. Наиболее экологично и экономически выгодно использовать биологические особенности растительных рыб, которые в большом количестве поедают мягкую и жесткую водную растительность, а также водоросли. Этим рыб выращивают как биологических мелиораторов [2, 10].

Компоненты естественной кормовой базы (макрофиты) составляли значительную часть пищевого комка выращиваемых белых амуров [3, 4]. Доля макрофитов в пищевом комке в среднем за сезон составила 60–70 %. Поэтому при зарастаемости более 15 % в водохранилища необходимо вселять двухлетков белого амура, [5, 6, 7, 10].

При исследовании степени зарастаемости береговой зоны водохранилища наиболее часто встречались виды, представленные в таблице. При этом абсолютным доминантом был представитель семейства злаковых – тростник обыкновенный (*Phragmites communis* L.), на долю этого вида приходилось от 47,0 до 95,0 % . Представители осоковых – камыш озерный (*Scirpus lacustris* L.), рогозовых – рогоз широколистный (*Typha latifolia* L.), рогоз узколистный (*Typha angustifolia* L.) и осока (*Carex gracilis* L) составляли от 0,5 до 23% площади рамки при подсчете растений (таблица).

Такие виды как хвощ (*Equisetum limosum* L.), частуха-подорожник (*Alisma plantago* L.) вербейник обыкновенный (*Lysimachia vulgaris* L.) занимали площадь зарастаемости от 0,5 до 4,0 %.

В практике рыбохозяйственных исследований установлено, что при наличии макрофитов рыбопродуктивность в водоемах уменьшается. Избыток макрофитов, поглощая биогенные элементы, ослабляет интенсивность всех последующих продукционных процессов, последовательно снижая биомассы фито- и зоопланктона.

Различия в степени зарастаемости различными видами обусловлено характером грунтов и составом почв, а также близостью к водоему, что способствовало росту влаголюбивых растений.

Таблица – Степень зарастаемости и видовой состав макрофитов прибрежной полосы Зельвенского водохранилища

Вид растений, %	№ станций (протяженность, м)						
	1 (1500)	2 (1500)	3 (900)	4 (700)	5 (1100)	6 (900)	7 (700)
Тростник	79,0	63,0	71,0	91,0	83,0	47,0	95,0
Камыш	5,0	25,0	12,0	4,0	15,0	10,0	2,5
Рогоз широколистный	5,0	5,0	4,0	3,0	–	23,0	–
Рогоз узколистный	4,0	3,0	2,0	2,0	–	16,0	–
Осока	1,0	–	0,5	–	1,0	–	0,5
Хвощ	4,0	0,5	–	–	0,5	0,5	0,5
Частуха-подорожник	0,5	–	–	–	0,5	2,0	0,5
Гречиха земноводная	1,0	0,5	0,5	–	–	1,0	0,5
Вербейник обыкновенный	0,5	–	0,5	–	–	0,5	0,5

Состав водорослей фитопланктона, вызывающих «цветение» воды, представлен в отличие от широко распространенных в водохранилищах *Aphanizomenon flos-aquae* и *Anabaena flos-aquae* почти исключительно видами рода *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. pulverea*, *M. wesenbergii*). Это представляет собой исключительную особенность «цветения» воды в Зельвенском водохранилище.

**Заключение.** Степень эксплуатации водоема невелика. Здесь развито преимущественно любительское рыболовство, ранее на водохранилище велся незначительный промысловый лов. В среднем промыслом в год добывалось менее 1 тонны рыбы, в основном леща.

Активное использование водохранилища сдерживается отсутствием научно обоснованной базы, в т.ч. научных данных по гидрологическим, гидрохимическим, гидробиологическим, ихтиологическим и ихтиопатологическим показателям.

Компоненты естественной кормовой базы (макрофиты) составляли значительную часть пищевого комка выращиваемых белых амуров. Доля макрофитов в пищевом комке в среднем за сезон составила 60 – 70 %. Избыток макрофитов при этом, поглощая биогенные элементы, ослабляет интенсивность всех последующих продукционных процессов, последовательно снижая биомассы фито- и зоопланктона.

#### Список использованных источников

1. Альгологическая характеристика водоема-охладителя Минской ТЭЦ-5: [влияние выращивания белого толстолобика на качество воды в водоеме] / В.В. Кончиц [и др.] // Аквакультура и интегрированные технологии: проблемы и возможности / Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыболовства. – Москва, 2005. – Т.1. – С. 227–232.

2. Жуков, П.И. Растительноядные рыбы Амурско-Китайского ихтиологического комплекса и их рыбохозяйственное использование в климатических условиях Республики Беларусь / П.И. Жуков, В.В. Кончиц; Академия аграрных наук Республики Беларусь, ГП «БелНИИрыбпроект». – Минск, 1998. – 54 с. – Библиогр.: С. 49–54.

3. Зиновьев, Е.А. Методы исследования пресноводных рыб : учеб. пособие / Е.А. Зиновьев, С.А. Мандрица ; М-во образования Рос. Федерации, Перм гос. ун-т. – Пермь : Перм. ун-т, 2003. – 115 с.

4. Калайда, М.Л. Методы рыбохозяйственных исследований: учебное пособие для студентов вузов./ М.Л. Калайда, Л.К. Говоркова. – СПб.: Проспект Науки, 2013. – 288 с.

5. Кончиц, В.В. Использование белого амурского амура как мелиоратора ирригационных и осушительных систем / В.В. Кончиц // Ресурсосберегающие технологии в аквакультуре: материалы второго международного симпозиума. – Москва; Адлер, 1999. – С. 46.

6. Кончиц, В.В. Растительноядные рыбы как объект поликультуры и биологической мелиорации водоемов / В.В. Кончиц, В.М. Муратов // Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве: материалы международной научно-практической конференции. – Минск, 1998. – С. 130–131.

7. Кончиц, В.В. Растительноядные рыбы как фактор, влияющий на состояние водоема / В.В. Кончиц // Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве: материалы международной научно-практической конференции. – Минск, 1998. – С. 128–129.
8. Липин, А.Н. Пресные воды и их жизнь / А.Н. Липин. – 3-е изд., перераб. – Москва : Учпедгиз, 1950. – 348 с.
9. Лупачева, Л.И. Изучение высшей водной растительности водоема – охладителя Мироновской ГРЭС / Л.И. Лупачева, Р.А. Балдажи // Журн. «Рыбное хоз-во» – Киев, 1971. – 75 с.
10. Рыбы: попул. Энцикл. Справ. / Белорус. Сов. Энцикл., Ин-т зоологии АН БССР; Под ред. П.И. Жукова. – М.: БелСЭ, 1989. – 311 с.: ил. – (Животный мир Белоруссии) Под общ. Ред. Л.М. Сушени).
11. Широков, В.М. Водохранилища Белоруссии. Справочник. // В.М. Широков, В.А. Пидопличко, Мн.: БГУ, 1992. – 80 с.

УДК 577.355.3

### **ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ФОТОСИСТЕМ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ, ОБРАБОТАННЫХ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ**

**Т.Г. Курьянчик, Н.В. Козел**

*Институт биофизики и клеточной инженерии*

*Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, t.kuryanchyk@gmail.com*

**Введение.** Ячмень – это зерновая культура, которая занимает ведущее место в сельскохозяйственном производстве Беларуси. Различные абиотические факторы окружающей среды, такие как засуха, засоление, высокая или низкая температура и многие другие влияют на все стадии роста и развития растений и способны приводить к изменению критически важных физиологических и биохимических процессов в растительном организме. Фотосинтез, как один из основных биологических процессов, также подвергается сильному воздействию стрессовых факторов. Стресс, вызванный засухой, и последующее снижение водного статуса клеток отрицательно влияет на скорость фотосинтеза, ограничивая диффузию  $\text{CO}_2$  через устьица, и потенциально вызывает образование высокорективных и цитотоксичных молекул – активных форм кислорода (АФК), которые способны повредить фотосинтетический аппарат (ФСА) растительной клетки, что, в конечном итоге, приводит к значительным потерям урожая [1].

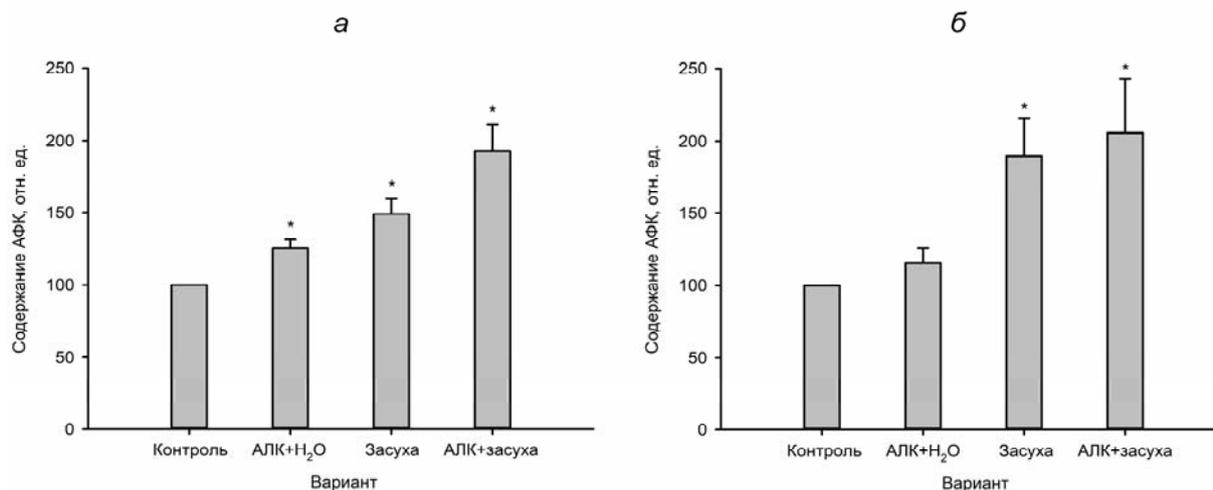
В условиях засухи ключевую роль играют адаптационные механизмы, в том числе и механизмы адаптации ФСА, позволяющие растению преодолеть стрессовое воздействие [2]. Экзогенное применение различных небольших молекул или регуляторов роста растений – хорошо известный метод повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды [3]. В последние годы большой интерес и популярность в сельском хозяйстве, и, в частности, в растениеводстве, приобретает использование 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – важнейшего метаболита растительной клетки, которая в низких концентрациях положительно влияет на рост и развитие растений в стрессовых условиях [4].

*Целью* данной работы являлось изучение влияния АЛК в концентрации 10 мг/л на содержание основных структурных белков фотосистем (ФС) в листьях проростков ячменя в условиях окислительного стресса, индуцированного почвенной засухой.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования в данной работе использовали 1-й настоящий лист зеленых 7-дневных проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) засухоустойчивого сорта «Бровар» [5] и сорта «Аванс», выращенных в лабораторных условиях в режиме 14 ч света (интенсивность 6 тыс. люкс) и 10 ч темноты под люминесцентными лампами Philips TD-36/765 при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха 30% в нормальных условиях (ежедневный полив водопроводной водой) и при засухе (растения не поливали с момента посадки в почву). Обработка АЛК в концентрации 10 мг/л производилась мелкодисперсным опрыскиванием на 4 сут после высадки в грунт. Варианты экспериментов были следующими: 1) Контроль: осуществляли ежедневный полив водопроводной водой, растения без обработки; 2) АЛК+ $\text{H}_2\text{O}$ : осуществляли ежедневный полив водопроводной водой, растения, обработанные АЛК; 3) Засуха: без полива, растения без обработки; 4) АЛК+засуха: без полива, растения, обработанные АЛК.

Определение общего содержания АФК *in vitro* проводили с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата (ДХФ-ДА), который после деацетилирования окисляется до флуоресцентного соединения ДХФ активными формами кислорода, такими как  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $ROO\cdot$  и др. [60]. Выделение из растений белков, их электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг с поликлональными антителами фирмы «Agrisera» на белки ФС выполняли, как описано в работе [7].

**Результаты и их обсуждение.** Для оценки степени стрессового воздействия на растения ячменя почвенной засухи мы проанализировали накопление в листьях опытных и контрольных вариантов общего количества АФК. Результаты, представленные на рисунке 1, четко демонстрируют индукцию окислительного стресса под действием почвенной засухи – во всех опытных вариантах мы наблюдали существенное (до 100%) увеличение содержания АФК в листьях ячменя.

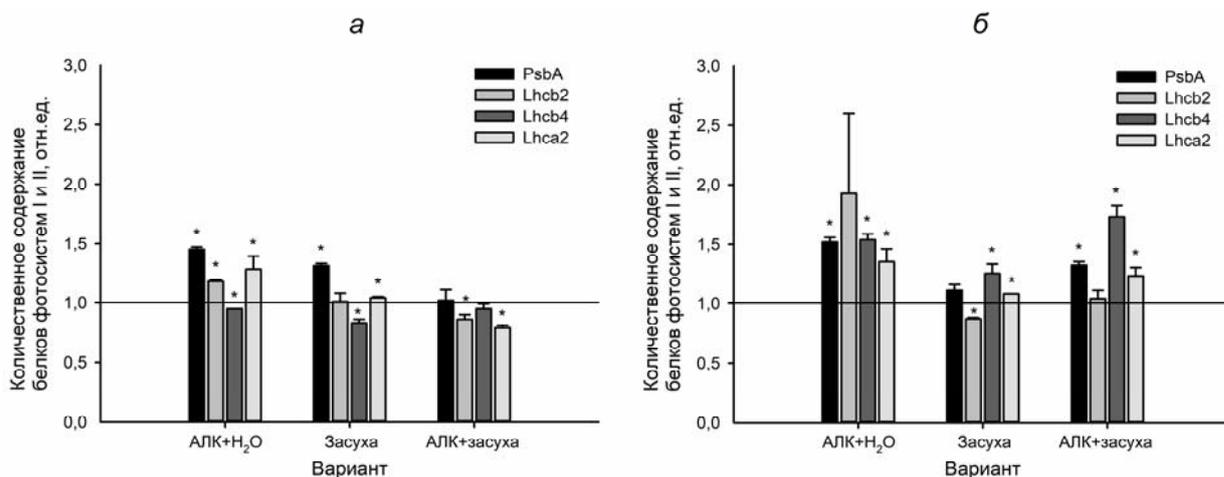


\* – различия по сравнению с контролем достоверны,  $p \leq 0,05$

**Рисунок 1.** – Изменение содержания АФК в листьях растений ячменя сортов «Бровар» (а) и «Аванс» (б), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи

Однако обращают на себя внимание два факта. Во-первых, обработка растений АЛК как в опытных (АЛК+засуха), так и контрольных вариантах (АЛК+H<sub>2</sub>O) в обоих сортах приводила к увеличению количества АФК по сравнению с необработанными растениями, что может быть причиной активации под действием малых концентраций АЛК метаболических процессов, в первую очередь фотосинтеза и дыхания [4, 8]. Во-вторых, нужно отметить более высокие содержания АФК в условиях засухи в листьях ячменя сорта «Аванс» по сравнению с сортом «Бровар», что указывает на более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях этого сорта при засухе.

Для определения количества основных структурных белков ФС в листьях проростков ячменя, обработанных АЛК в условиях засухи, проводили вестерн-блот анализ с использованием антител на белки ФС II – PsbA (белок D1 реакционного центра ФС II), Lhcb2 и Lhcb4 (белки антенны ФС II), и белок антенны ФС I Lhca2. Анализ содержания основных структурных белков ФС показал принципиально разную регуляцию синтеза этих компонентов хлоропластных мембран в ответ на действие почвенной засухи в сочетании с обработкой растений АЛК для сортов «Бровар» и «Аванс». Так, в листьях ячменя сорта «Бровар» при нормальном поливе АЛК стимулировала синтез белков ФС II – белка реакционного центра ФС II PsbA, белка внешней антенны ФС II Lhcb2, а также белка антенны ФС I Lhca2 (рисунок 2). При действии почвенной засухи обработка листьев АЛК, наоборот, приводила к снижению содержания белков антенных комплексов ФС, что является эффективным фотопротекторным механизмом защиты ФСА в таких условиях. Для сорта «Аванс» мы наблюдали противоположный ответ растительной клетки на обработку листьев АЛК в условиях засухи – количество всех проанализированных белков увеличивалось как относительно контроля, так и относительно варианта Засуха, что потенциально опасно с точки зрения развития в таких растениях фотоокислительного стресса при недостатке влаги.



контроль принят за 1 и представлен базовой линией; \* – различия по сравнению с контролем достоверны,  $p \leq 0,05$

**Рисунок 2 – Изменение содержания белков ФС в листьях растений ячменя сортов «Бровар» (а) и «Аванс» (б), обработанных АЛК, под воздействием почвенной засухи**

Полученный результат может объяснить существенно более интенсивное развитие окислительного стресса в растениях сорта «Аванс» по сравнению с сортом «Бровар» при действии почвенной засухи, отмеченное нами ранее, и указывает на наличие у сорта «Бровар» дополнительных механизмов, связанных с регуляцией синтеза структурных компонентов фотосинтетических мембран и определяющих его засухоустойчивость.

**Заключение.** Таким образом, установлено, что при засухе обработка листьев растений ячменя сорта «Бровар» АЛК вызывает снижение содержания белков антенных комплексов ФС, что приводит к уменьшению размера светособирающей антенны и является эффективным механизмом защиты ФСА в таких условиях. Для сорта «Аванс» наблюдался противоположный ответ растительной клетки на обработку листьев АЛК в условиях засухи – количество всех проанализированных белков фотосистем увеличивалось как относительно контроля, так и относительно варианта Засуха, что потенциально опасно с точки зрения развития в таких растениях фотоокислительного стресса при недостатке влаги.

#### Список использованных источников

1. Foyer, C. H. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub / C. H. Foyer, G. Noctor // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 155, № 1. – P. 2–18.
2. Bartels, D. Drought and Salt Tolerance in Plants / D. Bartels, R. Sunkar // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2007. – Vol. 24. – P. 24–28.
3. Chan, Z. Improved abiotic stress tolerance of bermudagrass by exogenous small molecules / Z. Chan, H. Shi // *Plant Signal. Behav.* – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. e991577.
4. Влияние 5-аминолевулиновой кислоты на рост растений ячменя и содержание пигментов / Е. Б. Яронская [и др.] // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : сб. ст. VI съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биоф., Минск, 6-8 окт. 2004 г. – Минск, 2004. – Т. 1. – С. 117–119.
5. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: методические указания / И. Н. Доманская [и др.]. – Минск : Право и экономика, 2011. – 31 с.
6. Козел, Н. В. Фотоокислительные процессы, индуцированные в растениях ячменя и табака сенситизаторами ксантоеновой природы : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Н. В. Козел. – Минск, 2009. – 146 с.
7. A point mutation in the photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 gene confers variegation in *Helianthus annuus* L. / K. Azarin [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00997-x>.
8. Beyzaei, Z. Involvement of nitrate reductase in the ameliorating effect of 5-aminolevulinic acid on NaCl-stressed barley seedlings / Z. Beyzaei, R. A. Sherbakov, N. G. Averina // *Acta Physiol. Plant.* – 2015. – Vol. 37, № 11. – P. 1–8.

## ВЛИЯНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НА ВСХОЖЕСТЬ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ СЕМЯН РАПСА, ОВСА И ГОРОХА

И.В. Мороз<sup>1</sup>, А.Н. Павлюк<sup>1</sup>, Л.И. Сапунова<sup>1</sup>, Е.Н. Урбанчик<sup>2</sup>, А.И. Масальцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет пищевых и химических технологий,  
Могилев Беларусь

На мировом рынке постоянно возрастает доля продуктов питания и косметических средств, содержащих проросшие семена различных сельскохозяйственных культур. Это обусловлено высоким содержанием в проростках белка, витаминов, минералов, антиоксидантов и других биологически активных веществ, которые благоприятно воздействуют на организм человека [1–4].

Проращивание семян зернобобовых приводит к катаболизму и деградации их основных макронутриентов (полисахаридов, белка и липидов), что сопровождается увеличением содержания простых углеводов, аминокислот и органических кислот. При прорастании происходит активизация ферментной системы семян, в результате чего гидролитические ферменты катализируют перевод в растворимую форму резервных веществ эндосперма, представленных, главным образом, крахмалом. В процессе участвуют протеазы, которые растворяют белковую оболочку крахмалсодержащих клеток, освобождая гемицеллюлозные структуры стенки для дальнейшего воздействия на них эндо- $\beta$ -глюканазы и других ферментов. После ферментативного гидролиза гемицеллюлоз и белкового матрикса, окружающего крахмальные зерна, полисахарид становится доступным субстратом для воздействия амилолитических ферментов.

Синтез эндогенных ферментов в прорастающих семенах в большинстве случаев регулируется механизмом обратной связи. Поэтому использование микробных энзимных препаратов при проращивании семян позволяет улучшить их качественные показатели, в том числе цвет, запах, вкус, увеличить содержание минералов, сахаров, эндогенных ферментов и других биологически активных веществ, а также сократить длительность и повысить экономичность процесса. Сообщается об использовании коммерческих ферментных препаратов для ускорения процесса проращивания зерна различных сельскохозяйственных культур и повышения качества проростков [5–10]. Так, получение ячменных проростков высокого качества обеспечивали ферментные препараты АПСубтилин П (Литва) и Целловиридин Г20х (Россия), Финизим 200Л (Дания), Биоцеллюлаза (Нидерланды), различающиеся соотношением  $\alpha$ -амилазной, протеазной,  $\beta$ -глюканазной, целлюлазной и гемицеллюлазной активности [6, 7]. К сокращению процесса солодоращения, повышению амилолитической, осахаривающей и протеолитической активности солода, его экстрактивности, увеличению выхода продукта, содержания в нем редуцирующих веществ и аминного азота приводила обработка семян ячменя АПСубтилином П на стадии замачивания [5, 7]. По мнению исследователей, в результате воздействия ферментов повышается проницаемость семенной оболочки, что приводит к увеличению притока воды и более полному гидролизу эндосперма зерна.

Ферментные препараты Нейтраза 1,5MG (Дания), Глюкозим New (Россия) и Биоглюканаза В10L (Нидерланды), стандартизованные по экзо- и эндо- $\beta$ -глюканазной, амилазной, протеазной, глюкоамилазной и пуллулазной активности, или их композиции при добавлении в замочную воду способствовали сокращению продолжительности солодоращения и сушки солода. При этом полученный продукт обладал высокой амилолитической, протеолитической и цитолитической активностью, повышенной экстрактивностью, в том числе за счет увеличения содержания аминокислот, гексоз и пентоз, определяющих цветность солода [8, 9].

Таким образом, применение экзогенных ферментов в процессе проращивания семян зерновых культур сопровождается не только существенным сокращением технологического цикла производства, экономией материальных и энергетических ресурсов, но также и улучшением качества готового продукта.

Цель настоящей работы – оценить влияние экзогенных ферментных препаратов на всхожесть и ферментативную активность семян рапса, овса и гороха.

В работе использовали зерно рапса (*Brassica napus* L.), овса (*Avena sativa* L.) и гороха (*Pisum sativum* L.) отечественной селекции, а также их проростки.

Активность протеазы,  $\beta$ -глюканазы, целлюлазы, ксиланазы, фитазы и липазы в составе ферментных препаратов, в нативном и пророщенном зерне определяли общепринятыми методами [11–15].

При оценке влияния ферментативной обработки зерна учитывали влажность [16] и всхожесть семян [17], длительность процесса проращивания.

В экспериментах использовали следующие коммерческие ферментные препараты: Комплиферм, Инкрифос, Фитазим (Беларусь), Вискоферм, Ронозим NP (СТ) (Дания), Новозим 25008, Ликвафло, Сахзайм Плюс 2х (Дания), Deltazym APS 2X и Deltazym VR RX (США), Lipase (Китай).

Обработку промытых, обеззараженных в течение 1,5 ч 0,0025 %-ным раствором перманганата калия и гидратированных в течение 8-10 ч семян рапса, овса и гороха проводили раствором ферментных препаратов в следующих условиях: относительная влажность воздуха – не более 70 %, температура воздуха – 20–25 °С, соотношение веса семян к объему водного раствора ферментных препаратов в диапазоне 1 : 5 – 1 : 10.

Емкость с подготовленными семенами заполняли раствором ферментных препаратов в холодной водопроводной воде, выдерживали в течение 8 ч при периодическом перемешивании. По истечении указанного времени раствор ферментов сливали, а семена оставляли в покое для проращивания в течение 8 ч. При проращивании менее 75 % семян их промывали водой и оставляли в покое для доращивания, после чего высушивали при температуре не более 60 °С до влажности 12–14 % и измельчали.

Влияние ферментативной обработки на зернобобовое сырье изучали *in vitro* в сравнении с контролем (без ферментативной обработки).

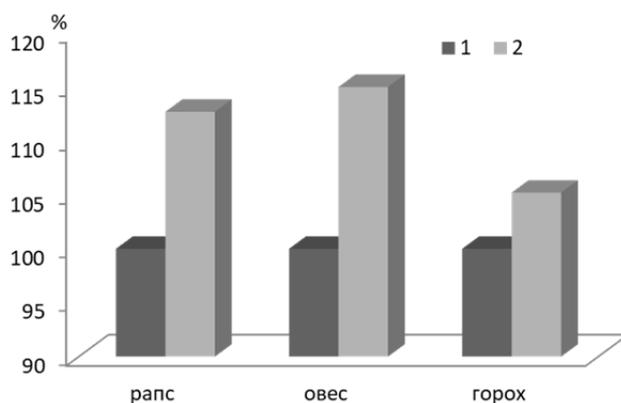
Приведенные результаты получены путем усреднения данных 2–3 опытов, выполненных в трех повторностях.

Результаты выполненных исследований по установлению компонентного состава ферментных препаратов, применяемых в процессе проращивания семян рапса, овса и гороха, и их эффективной дозы суммированы в таблице.

Таблица – Состав ферментных комплексов и дозы отдельных ферментов, эффективных в процессе проращивания семян зернобобовых культур

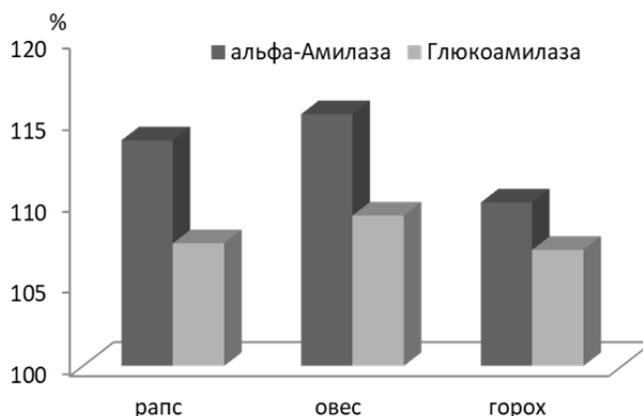
Зернобобовое сырье	Фермент	Доза, ед/г сухих веществ субстрата
Рапс	$\alpha$ -Амилаза	10–15
	Ксиланаза	37–39
	Целлюлаза	2–4
	$\beta$ -Глюканаза	34–35
Овес	Протеаза	0,010–0,012
Горох	$\alpha$ -Амилаза	1–4
	Ксиланаза	4–5
	Целлюлаза	0,2–0,3
	$\beta$ -Глюканаза	3–4

Установлено, что ферментативная обработка семян указанных зернобобовых культур на этапе проращивания повышает их всхожесть (на 5,2–15,0 %) и ферментативную активность (амилолитическую – на 10,0–15,4 %, глюкоамилазную – на 7,1–9,2 %), сокращает процесс на 4–8 ч (рисунки 1–3).

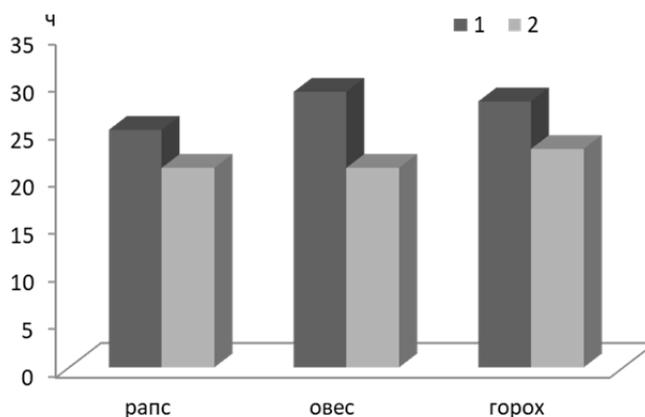


1 – без обработки ферментными препаратами; 2 – с обработкой ферментными препаратами

**Рисунок 1. – Влияние ферментативной обработки на всхожесть семян рапса, овса и гороха**



**Рисунок 2. – Относительная амилолитическая активность семян рапса, овса и гороха, пророщенных с использованием ферментных препаратов**



1 – без обработки ферментными препаратами; 2 – с обработкой ферментными препаратами

**Рисунок 3. – Влияние ферментативной обработки на длительность пророщивания семян рапса, овса и гороха**

Следует отметить, что экспериментальные данные, касающиеся применения ферментов для интенсификации процесса пророщивания семян рапса, овса и гороха и повышения содержания в них биологически активных веществ, получены впервые.

Таким образом, в результате выполненных исследований обоснован компонентный состав ферментных комплексов и эффективные дозы отдельных ферментов, ускоряющих процесс пророщивания семян рапса, овса и гороха и способствующих повышению содержания биологически активных веществ в проростках. Показано, что ферментативная обработка семян исследованных

зернобобовых культур на этапе проращивания повышает их всхожесть и ферментативную активность, существенно сокращает процесс. Полученные результаты могут найти применение при разработке в рамках государственных научно-технических программ опытно-промышленной ресурсосберегающей технологии получения проростков зернобобовых культур, обогащенных биологически активными веществами и востребованных для производства натуральных косметических средств, продуктов здорового питания.

#### Список использованных источников

1. Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by *in vitro* and *in vivo* techniques / G. Urbano [et al.] // Nutrition. – 2005. – Vol. 21, № 2. – P. 230–239.
2. Effects of enzyme activities during steeping and sprouting on the solubility and composition of proteins, their bioactivity and relationship with the bread making quality of wheat flour / S. Zilic [et al.] // Food Funct. – 2016. – Vol. 7, № 10. – P. 4323–4331.
3. Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable / K.H. Wang [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53. – P. 242–246.
4. Shi, H.L. Comprehensive profiling of isoflavones, phytosterols, tocopherols, minerals, crude protein, lipid, and sugar during soybean (*Glycine max*) germination / H.L. Shi, P.K. Nam, Y.F. Ma // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol. 58. – P. 4970–4976.
5. Казакова, Е.А. Проращивание ячменя с применением хлорида кальция и ферментного препарата / Е.А. Казакова, Г.А. Ермолаева // Пиво и напитки. – 2004. – № 2. – С. 30–31.
6. Получение пивоваренного солода с применением ферментного препарата Целловиридин Г20х / И.Н. Грибкова [и др.] // Прогрессивные пищевые технологии – третьему тысячелетию: Междунар. Науч. Конф., Краснодар, 19-22 сент. 2000 г.: тез. – Краснодар, 2000. – С. 101.
7. Казакова, Е.А. Интенсификация солодоращения с применением биокатализаторов при производстве светлого солода: автореф. Дис. ...канд. тех. Наук: 05.18.07 / Е.А. Казакова; ФГБОУ ВО «МГУПП». – М., 2005. – 26 с.
8. Казакова, Е.А. Применение биокатализаторов в солодоращении / Е.А. Казакова [и др.] // Молодые ученые – пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические аспекты производства): научно-техн. Конф., М., 1997 г.: тез. Докл. / М-во общ. И проф. Образования Р.Ф, МГУПП, РАСН. – М., 1999. – С. 42–43.
9. Грибкова, И.Н. Разработка технологии темного солода с применением биокатализаторов: автореф. Дис. ...канд. тех. Наук: 05.18.07 / И.Н. Грибкова; Моск. Гос. Ун-т пищевых пр-в. – М., 2006. – 26 с.
10. Кузнецова, Е.А. Распределение токсичных элементов в зерновом сырье и снижение их содержания при применении ферментных препаратов / Е.А. Кузнецова, Л.В. Черепнина, А.А. Щербакова // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 12. – Режим доступа: [www.rae.ru](http://www.rae.ru). – Дата доступа: 19.03.2009.
11. ГОСТ 20264-89 Препараты ферментные. Методы определения амилалитической активности / Государственный Комитет СССР по стандартам. – М.: Изд-во стандартов, 1990. – 24 с.
12. ГОСТ 20264.2-88 Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности / Государственный Комитет СССР по стандартам. – М.: Изд-во стандартов, 1988. – 11 с.
13. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений  $\beta$ -глюкогалактосидазной, ксиланазной, целлюлазной активностей: МВИ. МН 3235-2009. – Октябрьский, 2009. – 26 с.
14. Препараты ферментные. Методика выполнения измерений фитазной активности: МВИ. МН 3234-2009. – Октябрьский, 2009. – 26 с.
15. Yang, G. Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. By encapsulation in hydrophobic sol-gel materials / G. Yang [et al.] // Bioresour. Technol. – 2009. – Vol. 100, No 19. – P. 4311–4316.
16. ГОСТ 13586.5-93 Зерно. Метод определения влажности. – Стандартиформ, 2009. – 8 с. (введ. 01.01.1995).
17. ГОСТ 12039-82 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения жизнеспособности. – Стандартиформ, 2011. – 42 с. (введ. 01.07.1983).

И.А. Найденко, В.В. Денисенко, М.Е. Сафонова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

**Введение.** Молочнокислые бактерии – группа грамположительных факультативно анаэробных микроорганизмов, объединяющая представителей родов *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* и др. по способности сбраживать углеводные субстраты с образованием молочной кислоты в качестве основного продукта.

Эти микроорганизмы традиционно широко используются в разных отраслях: в хлебопечении, консервировании овощей и фруктов, получении разнообразных кисломолочных продуктов, при засоле рыбы, изготовлении некоторых мясных продуктов, получении молочной кислоты, для синтеза декстрана, как основа препаратов пробиотического действия и др.

Важной областью применения молочнокислых бактерий является кормопроизводство – получение силосованных кормов. Силосование представляет собой сложный биологический процесс, основанный на деятельности микроорганизмов. При этом в силосуемой массе без доступа воздуха в результате микробиологических и биохимических процессов накапливаются органические кислоты, в основном молочная и уксусная. Максимальное стимулирование в силосуемой массе молочнокислого брожения, позволяющего наиболее эффективно трансформировать углеводы в молочную кислоту, способствует минимизации потерь питательных веществ в корме. В то же время в составе естественной эпифитной микрофлоры исходной растительной массы содержание молочнокислых бактерий часто недостаточно для обеспечения быстрой ферментации и получения качественного силоса.

Для сокращения потерь в процессе силосования и повышения качества корма используют многие приемы, в том числе внесение в зеленую массу разных добавок – ферментируемых углеводов, биологических препаратов, химических консервантов, ферментных препаратов и др. Использование бактериальных заквасок является экологически безопасным и одним из наиболее эффективных способов, обеспечивающих заготовку качественного корма.

Молочнокислые бактерии являются основным компонентом большинства силосных заквасок. Внесение в силосуемую массу препаратов на основе специально отобранных культур молочнокислых бактерий позволяет интенсифицировать процесс молочнокислого брожения, быстро снизить pH, подавить развитие нежелательных микроорганизмов, жизнедеятельность которых связана с расходом белков, накоплением масляной кислоты и токсичных аминов. В результате регулирующего действия заквасочной микрофлоры сокращаются потери белковых и других питательных веществ в процессе силосования, корм обогащается биологически активными соединениями, в нем оптимизируется соотношение органических кислот, улучшаются органолептические качества.

В связи с этим актуальным является выделение из природных источников и отбор новых активных штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для включения в состав препаратов предназначенных для повышения качества силосованных кормов.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследований служили выделенные из растительных источников штаммы молочнокислых бактерий, а также исходная зеленая масса и разные варианты силосуемых кормов.

Выделение, первичную идентификацию и изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий проводили общепринятыми методами [1,2].

Культивирование бактерий (глубинное или поверхностное, в жидких или на агаризованных средах, в аэробных или микроаэробных условиях) осуществляли в термостате при 25-37<sup>0</sup>С. В качестве посевного материала использовали 18-часовые физиологически активные (инокулят III генерации) культуры бактерий, 0,5 – 1,0 об. % которых вносили в питательную среду. Молочнокислые бактерии поддерживали на слабо агаризованной среде MRS [3].

Морфологию бактерий изучали на препаратах живых и фиксированных окрашенных клеток с использованием световой и фазово-контрастной микроскопии. Окраску по Граму проводили в модификации Хукера [1]. Основные физиолого-биохимические характеристики исследуемых культур определяли с использованием общепринятых методов [1–4].

Активность кислотообразования определяли титрометрическим и потенциометрическим методами. pH измеряли потенциометрически с помощью мембранного pH-метра HI-8314 (Hanna instruments, Португалия). Титруемую кислотность культуральной жидкости определяли титрометрическим методом. Результаты выражали в градусах Тернера ( $^{\circ}\text{T}$ ).

**Результаты и обсуждение.** Из разных растительных источников и вариантов силосованных кормов методами накопительной культуры и прямого высева образцов нами было выделено более 200 изолятов.

Полученные чистые культуры характеризовались бродильным типом метаболизма глюкозы с образованием кислых продуктов, отсутствием цитохромсодержащих дыхательных систем, отрицательной реакцией на каталазу и в большинстве случаев – на нитратредуктазу, аэротолерантностью, требовательностью к ростовым факторам. Совокупность перечисленных свойств, а также характерные морфолого-культуральные признаки (аспорогенные неподвижные грамположительные палочковидные и кокковидные клетки, равномерный рост по уколу в агаризованной среде, слабый поверхностный рост или его полное отсутствие, типичные глубинные колонии) позволили отнести выделенные бактерии к группе молочнокислых.

Важным признаком штаммов – потенциальных компонентов бактериальных препаратов для силосования растительного сырья – является высокая активность кислотообразования.

Выделенные микроорганизмы различались по активности роста и кислотообразования. Среди изучаемых культур были сильные и слабые кислотообразователи (таблица).

Слабые кислотообразователи, подкисляющие культуральную жидкость не более чем до  $45^{\circ}\text{T}$ , выделялись преимущественно из вегетирующих растений; единичные штаммы – из измельченной растительной массы и на 14-е, 93-и, 133-и сутки силосования.

Источником выделения штаммов молочнокислых бактерий с уровнем ацидогенеза выше  $50^{\circ}\text{T}$  служили преимущественно силосуемые корма разных вариантов.

Культуры, подкисляющие среду более  $200^{\circ}\text{T}$ , в среднем выделялись на 34-41 день позже, чем штаммы с активностью кислотообразования в пределах  $51-200^{\circ}\text{T}$  (таблица).

Большинство выделенных штаммов образовывали типичные чечевице- и лодочкообразные колонии, расположенные в толще среды.

Предварительная идентификация выделенных микроорганизмов с использованием разработанных нами дифференцирующих схем позволила выявить таксономическое разнообразие молочнокислых бактерий, выделяемых из микробного ценоза силосуемых растений: представители родов *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*.

Кокковидные молочнокислые бактерии выделялись преимущественно из вегетирующих растений, измельченной растительной массы и силоса на начальных этапах брожения. Около 30% молочнокислых бактерий, выделенных на 7-е сутки силосования злаковой травосмеси, были представлены кокками. В микробном ценозе разных вариантов силоса более поздних сроков созревания преобладали палочковидные формы.

Выявлено некоторое возрастание уровня активности кислотообразования выделяемых молочнокислых бактерий по мере увеличения срока хранения силоса из злаковой травосмеси от 1 до 3 месяцев и силоса из кукурузы – от 1 до 2 месяцев. Это может быть обусловлено создающимися селективными условиями для развития ацидофильных микроорганизмов по мере сбраживания растительной массы и повышения в ней уровня активной кислотности.

Таблица – Активность кислотообразования молочнокислых бактерий

Титруемая кислотность, $^{\circ}\text{T}$	Среднее значение титруемой кислотности в группе, $^{\circ}\text{T}$	Среднее значение срока хранения силоса – источника выделения большинства штаммов, сутки	Вариант, из которого выделено большинство штаммов группы
16-48	35,0	9,7	Эпифитная микрофлора
51-100	72,3	46,1	Силосованные корма
101-150	127,0	42,1	Силосованные корма
151-200	179,6	49,2	Силосованные корма
201-246	221,5	83,3	Силосованные корма

**Заключение.** Проведенные исследования позволили отобрать штаммы с высоким уровнем ацидогенеза и создать коллекцию культур бактерий, перспективных для дальнейшего изучения их с целью отбора для включения в состав бактериальных препаратов для силосования разного растительного сырья.

Как один из приемов повышения эффективности поиска активных кислотообразователей можно рекомендовать рациональный выбор источника выделения молочнокислых бактерий. Штаммы с высоким уровнем ацидогенеза чаще выделяются из силоса более длительного срока хранения.

#### Список использованных источников

1. Квасников, Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – Москва: Наука, 1975. – 390 с.
2. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. – Москва: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.
3. Man, J.C. A medium for the cultivation of Lactobacilli / J.C. Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23, № 1. – P. 130–135.
4. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. – Москва: Мир, 1984. – Т. 2. – 470 с.

УДК 663.4(076)

### СВОБОДНЫЙ АМИННЫЙ АЗОТ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ПИВОВАРЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

Т.С. Пицко, И.В. Коктыш

*Международный государственный экологический институт им. А.Д.Сахарова  
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, [tspitsko@gmail.com](mailto:tspitsko@gmail.com)*

**Аннотация:** Концентрация и аминокислотный состав сусла влияют на ферментативные процессы при производстве пива. Спектрофотометрическим методом исследована концентрация свободного аминного азота в пиве. Показатели свободного аминного азота в пиве с нормальной плотностью (10-12%), из соложенного сырья и с добавками несоложенного сырья находились в диапазоне от 82 до 130 мг/л. Сравнительный анализ свободного аминного азота между образцами пива из соложенного сырья и пивом с добавками несоложенного сырья показал наличие статистически значимых различий ( $p < 0,05$ ). Полученные данные указывают, что от качественного и количественного состава усваиваемых аминокислот зависит тип реакций у дрожжей, которые формируют не только физико-химические свойства, но окончательный ароматический профиль пива.

**Ключевые слова:** пивоварение, контроль качества, свободный аминный азот, спектрофотометрия

Для поддержания стабильности качества и вкуса пива производителями необходимо проводить различные анализы. Одним из таких тестов может стать тест на свободный аминный азот, который позволяет оценить эффективность процессов ферментации, установить содержание белка.

Для определения азотистых компонентов сусла/пива используется показатель соединений азота – свободный аминный азот (free amino nitrogen, FAN), который метаболизируется дрожжами во время брожения. К ним относят отдельные альфа-аминокислоты сусла, аммиак и небольшие пептиды (ди- и трипептиды). Несмотря на то, что в сусле растворен широкий спектр азотсодержащих соединений, пивоваренные дрожжи могут усваивать только более мелкие молекулы, а именно FAN, который в свою очередь является одним из параметров ферментации пива. Образование высших спиртов по пути Эрлиха происходит при поглощении аминокислот. Принятая в настоящее время элементарная ферментативная последовательность пути Эрлиха включает трансaminaзу, декарбоксилазу и алкогольдегидрогеназу. Трансaminaзы катализируют перенос аминов между аминокислотами и соответствующей  $\alpha$ -кетокислотой, используя глутамат/ $\alpha$ -кетоглутарат в качестве донора/акцептора. После переаминирования оставшиеся  $\alpha$ -кетокислоты могут быть декарбоксилированы с образованием соответствующего альдегида. После декарбоксилирования сивушные альдегиды вступают на последнюю стадию пути Эрлиха, на которой они превращаются в соответствующие спирты под действием алкогольдегидрогеназы. Хотя этот путь является наиболее изученным и обсуждаемым, высшие спирты также образуются во время восходящего (анаболического пути) биосинтеза аминокислот. От качественного и количественного состава усваиваемых аминокислот зависит тип реакций у дрожжей, которые сформируют окончательный

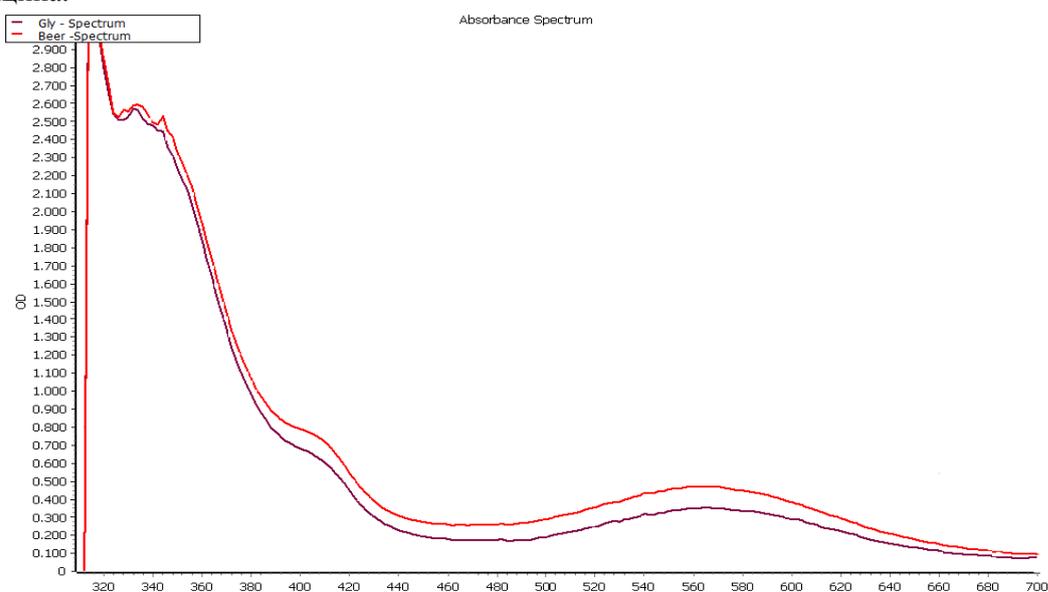
ароматический профиль пива. Наиболее важным является синтез *de novo* аминокислоты с разветвленной цепью через путь изолейцин–лейцин–валин.

**Цель исследования** – установить концентрацию свободного аминного азота в пиве белорусского производства для разработки критериев оценки качества пивоваренной продукции.

**Материалы и методы исследования.** Стандартные анализы контроля качества пивоварения включают тест на свободный аминокислотный азот (FAN), который позволяет оценить содержание белка. Традиционный способ определения содержания белка в пиве основан на анализе Кьельдаля, который является сложным и довольно дорогостоящим. Альтернативой является микроанализ с использованием нингидрина [2].

При проведении исследования использовалось 30 образцов пивоваренной продукции производства Республики Беларусь от различных производителей с нормальной плотностью (10-12%), из соложенного сырья и с добавками несоложенного сырья. Первичные аминокислоты (FAN) определяли в реакции с нингидрином в микропланшете. В качестве стандарта использовалась аминокислота глицин. Проводился спектральный анализ образцов в диапазоне от 300 до 700 нм, а также регистрация результатов анализа при максимуме поглощения (575 нм) с помощью мультиридера CLARIOstar<sup>Plus</sup> (BMGLabtech, Германия). Статистический анализ полученных данных проведен с помощью непараметрических статистических методов с применением пакета прикладных программ STATISTICA 8.0.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В исследованных образцах пива установлено содержание свободного аминного азота в диапазоне от 82 до 130 мг/л. На рисунке представлены типичные спектры поглощения образца пива с нормальным значением FAN (118 мг/л) и стандарта глицина.



**Рисунок – Спектры поглощения для пива (красный) и стандарта глицина (фиолетовый)**

Добавление аминокислот с разветвленными боковыми цепями, таких как валин, лейцин и изолейцин, в бродящее сусло увеличивает образование соответствующих сивушных спиртов (изобутанола, изоамилового и амилового спиртов). Пролин также способствует увеличению образования сивушных спиртов. Поскольку пролин не может быть преобразован в более высший спирт по пути Эрлиха, его роль в индукции образования сивушного спирта отнесена к синтезу глутамата. Добавление в сусло лизина и гистидина улучшает производительность пивных дрожжей при производстве лагерного пива. По сравнению с лизином гистидин больше влияет на ароматический профиль пива, увеличивая образование высших спиртов и сложных эфиров.

Содержание и состав FAN являются основными факторами, влияющими на образование диацетила при брожении пива. Сусло с меньшим количеством FAN производит меньше диацетила во время ферментации. Наличие FAN ниже критических уровней стимулирует синтез *de novo* валина, увеличивая количество  $\alpha$ -ацетолактата. Поглощение валина уменьшается с увеличением содержания FAN [1]. Чем меньше FAN (следовательно, меньше аминокислот), тем быстрее потребляются предпочтительные аминокислоты, что дает больше шансов валину проникнуть в клетку. И наобо-

рот, чем больше аминокислот доступно для проникновения в дрожжевую клетку, тем сложнее валину проникнуть в клетку.

Одной из наиболее распространенных стратегий для снижения затрат является использование несоложенного сырья. Однако такое сырье содержит мало FAN и не обладает ферментативной активностью во время затирания. Следовательно, чем выше соотношение несоложенного сырья, используемых в рецептуре, тем беднее будет сусло. Дрожжи будут компенсировать этот недостаток FAN с помощью анаболического пути образования аминокислот из углеводов, что приведет к повышенному образованию высших спиртов [1]. Увеличение производства высших спиртов также является распространенной проблемой при непрерывном брожении. Увеличение производствасивушных спиртов путем непрерывной ферментации является результатом работы как катаболических, так и анаболических путей. С одной стороны, непрерывное введение аминокислот в ферментер непрерывного действия неизбежно повышает образование высших спиртов по пути Эрлиха. С другой стороны, повышенная доступность предпочтительных аминокислот ухудшает потребление менее предпочтительных, следовательно, происходит запуск анаболического пути.

Для получения качественного как по органолептическим, так и по физико-химическим характеристикам пива, химический состав воды, сорт и вид ячменя, соложение играют важную роль в биохимических процессах ферментации пива. Разные сорта пива требуют разного химического состава воды. Корректировки включают удаление взвешенных твердых частиц, снижение нежелательного содержания минералов и удаление микробного загрязнения. Таким образом, различные минеральные ионы будут по-разному влиять на процесс пивоварения или конечный вкус пива. Например, сульфаты повышают крепость и сухость пива, но также благоприятствуют раскрытию хмелевого букета. Высокое содержание железа и марганца может изменить цвет и вкус пива. Кальций самый важный ион. Он защищает  $\alpha$ -амилазу от ранней инактивации путем снижения pH до оптимального для ферментативной активности. Во время кипячения кальций не только способствует осаждению избытка соединений азота, но и предотвращает чрезмерную экстракцию компонентов хмеля. Кроме того, кальций также играет решающую роль в процессе ферментации, поскольку он является обязательным для флокуляции дрожжей. Росту и брожению дрожжей способствуют ионы цинка, но препятствуют нитриты [1].

В основном в пивоварении используются два вида ячменя: двухрядный и шестирядный. Двухрядный ячмень богат крахмалом. И наоборот, в шестирядном ячмене меньше крахмала, но больше белка. Поэтому в случае необходимости увеличения содержания экстракта используется двухрядный ячмень, тогда как, если целью является ферментативная активность, лучшим выбором будет шестирядный.

В процессе соложения зерна проращивают для получения соответствующего солода. Однако правильная степень прорастания семян является ключом к получению хорошего солода. Во время прорастания эмбрион растет за счет резервного материала, хранящегося в ядре. Как только зерно вступает в контакт с подходящими условиями во время замачивания (оптимальная влажность и температура), весь ферментативный аппарат постепенно активизируется для разрушения запасов крахмала и белков с образованием нового растения. В этом заключается решающая роль соложения, которая заключается в обогащении солода ферментами (амилолитическими, протеолитическими и т.д.), модификации эндосперма ядра и образовании вкусовых и ароматических соединений. Ферменты, разрушающие крахмал (такие как  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза,  $\alpha$ -глюкозидаза и декстриназа), образующиеся во время прорастания, характеризуются лучше, чем протеолитические аналоги [3].

Оптимальная стадия для прерывания прорастания, это когда солод богат ферментами, достиг достаточной модификации эндосперма и использовал как можно меньше резервных материалов (крахмал, белки) во время развития эмбриона. На этом этапе прорастание задерживается обжигом (сушкой). Различные сорта солода получают с этого момента путем обжига или обжарки при различных температурах. Однако, чем больше солод подвергается термической обработке, тем больше повреждение ферментов. Таким образом, в то время как светлый солод богат ферментами, шоколадный солод (тщательно обжаренный) практически не обладает ферментативной активностью. При использовании смесей несоложенного ячменя и солода наблюдается ингибирующее действие на эндопептидазы солода, что приводит к уменьшению количества сусла, без влияния на извлечение углеводов при затирании.

Согласно МЕВАК (Центрально – Европейская комиссия анализа пивоварения) нормативными значениями FAN для пива нормальной плотности являются 100-120 мг/л. Из 30 исследуемых образцов с нормальной плотностью (10-12%) пивоваренной продукции от различных белорусских

производителей только 3 соответствовало референтным показателям. В тоже время, сравнительный анализ FAN между образцами пива из соложенного сырья и пивом с добавками несоложенного сырья показал наличие статистически значимых различий ( $p < 0,05$ ).

Полученные нами данные свидетельствуют о влиянии на процесс ферментации и на образование побочных продуктов брожения низкомолекулярных соединений азота, в частности аминокислот в сусле. Фактически, для получения пива высокоплотного либо пива с нормальной плотностью, обработка сусла протеазами увеличивает конечный FAN, что в конечном итоге увеличивает производство высших спиртов и сложных эфиров пивоваренными дрожжами.

**Заключение.** Таким образом, определение свободного аминного азота позволяет оценить качество ферментации пива. Низкомолекулярные соединения азота, в частности аминокислоты в сусле, а также их концентрация и состав оказывают влияние на процесс ферментации и на образование побочных продуктов брожения, определяя органолептические свойства пива. Контроль нормативного содержания аминного азота позволит стандартизировать технологию производства пива и повысить экспортный потенциал выпускаемой продукции.

#### Список использованных источников

1. Pires, E. Biochemistry of Beer Fermentation / E. Pires, T. Brányik. – New York: Springer, 2015. – 76 p.
2. Abernathy, D. Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay / D. Abernathy, G. Spedding, B. Starcher // J. Inst. Brew. – 2009. – Vol.115, №2. - P.122-127.
3. Stanbury, P. F. Principles of Fermentation Technology / P.F. Stanbury, A. Whitaker, S. J. Hall. – 3rd ed. – United Kingdom: Elsevier, 2017. – 803 p.

УДК 577.213+615.28

### СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛАВНЫХ АНТИГЕННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОПРОТЕИНА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 2-ГО ТИПА В СОСТАВЕ ФЬЮЖН-БЕЛКОВ В ШТАММАХ *ESCHERICHIA COLI*

О.В. Пластинина, Н.В. Сауткина, В.А. Прокулевич

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, oksana02plastinina@gmail.com

Вирусная диарея крупного рогатого скота (Bovine Viral Diarrhoea Virus, BVDV) является одной из преобладающих причин смертности и заболеваемости животных. Значительные экономические убытки, складывающиеся из снижения удоя во время болезни, сниженной репродуктивности, падежа зараженного скота, уменьшения количества молодых особей из-за низкой выживаемости и затрат на лечение и профилактику болезни, затрагивают страны всех континентов.

Заболевание вызывает группа вирусов BVDV, принадлежащих к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Контроль распространения вируса обеспечивается удалением из стада персистентно инфицированных животных, формированием уровня биобезопасности хозяйств и вакцинацией животных.

Вирион вируса BVDV представляет собой нуклеокапсид, в котором заключен одноцепочечный РНК-геном. Основным гликопротеином липидной оболочки является белок E2, который можно рассматривать в качестве объекта для создания субъединичной вакцины, т.к. именно на гликопротеин E2 направлено действие нейтрализующих антител зараженных животных.

На данный момент существуют данные по эффективности вакцины, основой для которой стал экспрессированный в клетках млекопитающих усеченный вариант гликопротеина E2 (tE2), в котором отсутствуют 32 аминокислоты трансмембранной области. Полученные результаты показали, что титры серонейтрализующих антител против BVDV, образование которых вызвано субъединичной вакциной, сопоставимы с титрами, требуемыми для удовлетворительной вакцины против BVDV [1].

Ранее в результате клонирования в клетках *E. coli* открытой рамки считывания, кодирующей полноразмерный белок E2 вируса BVDV 2-го типа, было установлено, что белок экспрессируется преимущественно в нерастворимом виде [2]. Причиной этому могут быть содержащиеся в молекуле 17 цистеиновых остатков, образующих внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи,

причем 9 остатков располагаются в доменах В и D [3] (в других источниках эти два домена объединяются в один – домен III [4]). Так как за связывание вируса с мембраной клетки и проникновение в неё отвечают только первые два домена [4], в качестве субъединичной вакцины можно рассматривать усеченный вариант белка E2, содержащий только домены А и В (или домены I и II).

Мы уже провели работу по клонированию оптимизированных для экспрессии в клетках *E. coli* генов *DADB* и *DADBHis*, кодирующих домены А и В гликопротеина E2, в составе вектора pET-24b(+) (Novagen), а также экспрессировали их в клетках штамма *E. coli* BL21-Gold(DE3), в результате установили, что белки, названные соответственно *DADB* и *DADBHis*, экспрессируются в нерастворимой форме [5].

Для получения в клетках бактерии *E. coli* растворимого и правильно свернутого белка возможно использование технологии слияния генов и получения фьюжн-белков, в которых фьюжн-партнёром может выступать, например, белок малый убиквитин-подобный модификатор (small ubiquitin-related modifier, SUMO) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [6], стабилизирующий и повышающий растворимость фьюжн-партнёров.

Целью данной работы являлось клонирование гибридных генов *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis*, состоящих из последовательностей, кодирующих главные антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с белком малым убиквитин-подобным модификатором.

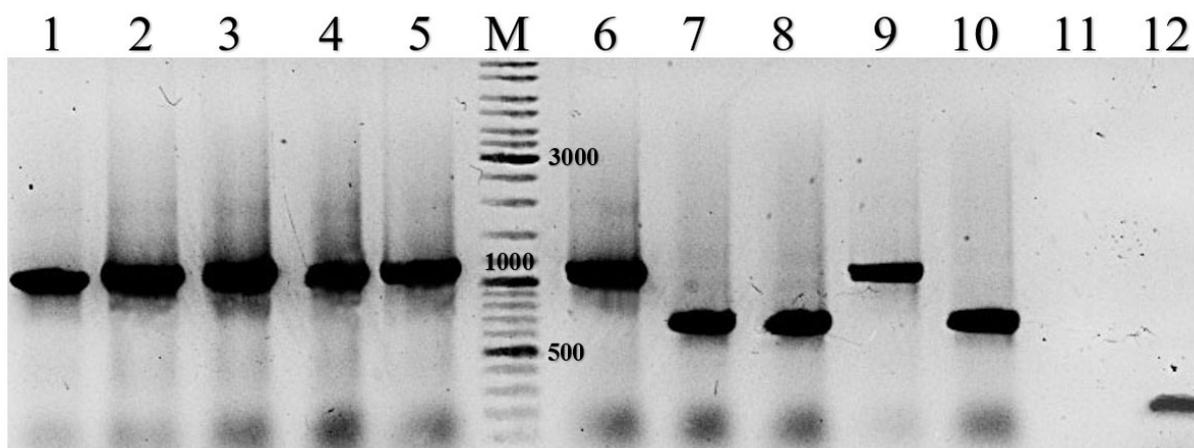
Для получения гибридных генов нуклеотидную последовательность *SUMO* (gBlock) амплифицировали с использованием праймеров PCV 1/2-R и PCV 1-1620, затем клонировали по сайту рестрикции NdeI и встраивали в плазмиды pDADB и pDADBHis. Далее рекомбинантными плазмидами pSUMO-DADB и pSUMO-DADBHis трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Полученные клоны трансформантов проверяли на наличие вставки ПЦР-анализом с помощью фланкирующих праймеров T7Promoter и T7Terminator для полилинкерной области плазмиды pET-24b(+). Характеристики использованных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1. – Характеристики использованных праймеров

Праймер	Последовательность 5'→3'	Размер, п.н.	Температура отжига, °С
PCV 1/2-R	gggacagcagttgaggagtaccat	24	60
PCV 1-1620	tttcggcgccatctgtaacgggttc	25	
T7Promoter	taatacgactcactataggg	20	47
T7Terminator	tatgctagtattgctcag	19	

Результаты электрофореграммы продуктов ПЦР-анализа трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB и *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis свидетельствовали о наличии 5 положительных клонов из 5 исследованных у трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB и 2 положительных клонов из 5 исследованных у трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis, т.к. на соответствующих дорожках зафиксировали наличие продукта размером около 1000 п.н. (ожидаемый размер гена *SUMO-DADB* – 1088 п.н., гена *SUMO-DADBHis* – 1077 п.н.) (рисунок 1). Параллельно использовали отрицательный контроль ПЦР, не содержащий матрицы, и пробу, содержащую нативную плазмиду pET-24b(+).

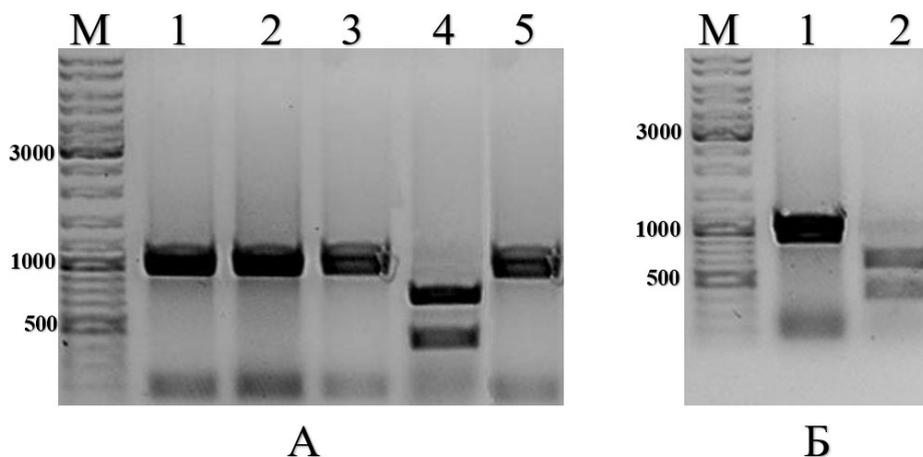
Поскольку последовательность *SUMO* клонировали по одному сайту рестрикции кроме ПЦР-анализа проводили также рестрикционный анализ для проверки правильности ориентации вставки. Для этого ампликоны *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis* обрабатывали рестриктазой NheI, сайт узнавания которой уникален для гибридных генов. По результатам рестрикционного анализа выявили правильную ориентацию вставки *SUMO* у ампликонов *SUMO-DADB* под номерами 1, 2, 3 и 5 (рисунок 2А) и *SUMO-DADBHis* под номером 1 (рисунок 2Б), т.к. размеры продуктов рестрикции для гена *SUMO-DADB* равны 943 и 145 п.н., а для гена *SUMO-DADBHis* – 932 и 145 п.н.



1-5 – положительные клоны трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB, 6, 9 – положительные клоны трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis, М – маркер молекулярного веса SM 0333 («Thermo Fisher Scientific Inc.»)

**Рисунок 1. – Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа трансформантов *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADB и *E. coli* XL1-Blue pSUMO-DADBHis**

При неправильной ориентации вставки *SUMO* у ампликона *SUMO-DADB* под номером 4 (рисунок 2А) и *SUMO-DADBHis* под номером 2 (рисунок 2Б) размеры продуктов рестрикции равны соответственно 682 и 406 п.н., 671 и 406 п.н.



А: 1-5 – ампликоны *SUMO-DADB*, 1-3, 5 – ампликоны с правильной ориентацией вставки.

Б: 1-2 – ампликоны *SUMO-DADBHis*, 1 – ампликон с правильной ориентацией вставки;

М – маркер молекулярного веса SM 0333 («Thermo Fisher Scientific Inc.»)

**Рисунок 2. – Электрофореграмма продуктов рестрикционного анализа амплифицированных фрагментов *SUMO-DADB* (А) и *SUMO-DADBHis* (Б)**

Таким образом, в результате проведенной работы в клетках штамма бактерий *E. coli* XL1-Blue клонированы гибридные конструкции *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis*, состоящие из генов, кодирующих главные антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с белком малым убиквитин-подобным модификатором дрожжей *S. cerevisiae*.

#### Список использованных источников

1. Safety and efficacy of an E2 glycoprotein subunit vaccine produced in mammalian cells to prevent experimental infection with bovine viral diarrhoea virus in cattle / A. Pecora [et al.] // Vet Res Commun. – 2012. – Vol. 36, No 3. – P. 157–164.

2. Экспрессия белка капсидной оболочки вируса диареи крупного рогатого скота в бактериальных клетках/ Н.В. Сауткина [и др.] // Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнологии

микроорганизмов» / г. Минск, БГУ; редкол.: В.А Прокулевич (председ.) [и др.]. – Минск, 2019. – 188–191.

3. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein e2 clarifies its role in cell entry / K.El Omari [et al.] // Cell Reports. – 2013. – Vol. 3, No 1. – P. 30–35.

4. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus / Y. Li [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – Vol. 110, No 17. – P. 6805–6810.

5. Клонирование главных антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота в клетках *Escherichia coli*: тез. докл. XII Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию Ин-та микробиологии / НАН Беларуси (Минск, 7–11 июня 2021 г.) / орг. ком. конф.: Э.И. Коломиец (председатель) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2021. – 264 с

6. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins / T. R. Butt [et al.] // Protein Expr. Purif. – 2005. – Vol. 43, No 1. – P. 1–9.

УДК60.604.606

## **ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ ПУТИ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

**Савина С.М., Дремук И.А., Емельянова А.В., Прищепчик Ю.В., Аверина Н.Г.**  
*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Беларусь  
svetlanapavluchkova@yandex.ru*

**Введение.** Антоцианы представляют собой нефотосинтетические пигменты растений, относящиеся к классу флавоноидов. Они играют важную физиологическую и экологическую роль в развитии растений, их защите от патогенов и неблагоприятных факторов внешней среды [1]. Так, обладая мощной антиоксидантной активностью, антоцианы непосредственно участвуют в детоксикации свободных радикалов. Очищенные растворы антоцианов удаляют практически все виды активных форм кислорода и азота с эффективностью в четыре раза большей, чем аскорбат и  $\alpha$ -токоферол [2]. Антоцианы активно поглощают излучение в УФ-области, защищая растения (в частности, генетический аппарат) от губительного действия УФ лучей.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению роли обогащенных антоцианами разных тканей и органов растений в формировании их стрессоустойчивости. Хорошим объектом для таких исследований является пшеница, для которой расшифрованы гены, контролирующие пигментацию отдельных ее органов, таких как колеоптилы (*Rc*-гены), стебли (*Pc*), зерно (*R*), перикарп (*Pp*), пыльники (*Pan*) и др. [3], а также показана регуляторная природа этих генов [3, 4]. Важная роль в формировании устойчивости растений к абиотическим и биотическим факторам внешней среды отводится колеоптилям пшеницы. Так, показана защитная роль антоцианов, содержащихся в колеоптилях проростков пшеницы, выращиваемых в присутствии ионов Cd [5]. Проростки пшеницы с интенсивно окрашенными в красный цвет колеоптилями и высоким содержанием антоцианов обладали большей устойчивостью к засухе по сравнению с растениями со слабо окрашенными органами и низким уровнем в них антоцианов [6].

Индукция накопления антоцианов в хозяйственно ценных сельскохозяйственных культурах, в том числе в озимых, может явиться весьма эффективным способом повышения устойчивости растений. 5-аминолевулиновая кислота (АЛК) – важнейший предшественник в системе биосинтеза тетрапирролов (хлорофиллов и гема), экологически безопасный природный регулятор роста растений и антистрессор, а также высокоэффективный индуктор накопления антоцианов. В литературе показано, что АЛК усиливает обусловленную антоцианами окраску плодов, улучшает не только товарный вид, но и вкусовые качества яблок, персиков, груш, китайской сливы [7]. В кожуре яблок, обработанных АЛК, отмечено повышение экспрессии генов ключевых ферментов системы биосинтеза антоцианов – *PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR* [8]. Наряду с этим, отсутствуют данные о влиянии экзогенной АЛК на систему биосинтеза антоцианов в злаковых культурах. Мы предположили, что с помощью экзогенной АЛК можно индуцировать повышение уровня экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза флавоноидов, и тем самым повысить содержание антоцианов в растениях озимой пшеницы.

Целью данного исследования являлось изучение влияния экзогенной АЛК на экспрессию регуляторного гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/TaMYB75, а также на экспрес-

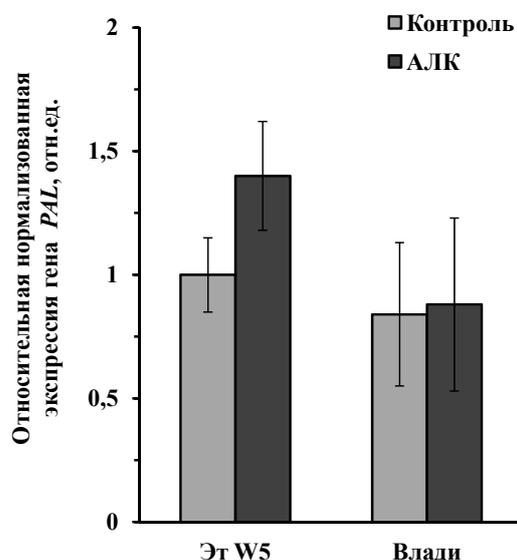
сию структурных генов пути биосинтеза антоцианов – *PAL*, кодирующего ключевой фермент фенилпропаноидного участка пути фенилаланин-аммоний-лиазу, и *CHS*, кодирующего начальный фермент флавоноидного участка пути халконсинтазу.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили колеоптилы 8-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Эт W5», характеризующегося красной окраской колеоптилей, и сорта «Влади», характеризующегося зеленой окраской колеоптилей. Семена пшеницы были любезно предоставлены Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр земледелия Национальной академии наук Республики Беларусь». Семена пшеницы предварительно замачивали в дистиллированной воде (контроль) или в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л (вариант «АЛК») на 2 ч при температуре  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , затем семена высаживали в грунт «Восторг» и выращивали в лабораторных условиях при температуре  $25\pm 2^\circ\text{C}$  до 8-дневного возраста.

Уровень экспрессии генов *PAL*, *CHS* и *PAP-1* оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием термоциклера C1000 Touch с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Суммарную РНК выделяли из свежих колеоптилей с помощью Tri-reagent (Sigma-Aldrich, США) и количественно определяли с помощью спектрофотометра ND-2000 (Thermo Scientific, США). Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК проводили с помощью набора реагентов ProtoScript II Reverse Transcriptase (New England BioLabs, США) в амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США) [9]. Реакцию ПЦР проводили с помощью 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР в реальном времени в присутствии EVA Green (Синтол, Россия) с использованием ген-специфичных праймеров для целевых генов *PAL* – CGCCGAGGCTATTGACATCT (прямой) и GTTCCTCACCGTGTCTTCA (обратный), *CHS* – AAAGGCGATCAAGGAGTGGG (прямой) и GGCGAAGACCGAGCATCTTA (обратный), *PAP-1* – ACAAGAAGCGCCCTGAAACT (прямой) и ACAGCGTTGGACCTGATGAA (обратный) и гена-нормализатора *act* – TGGACGTCACCAAC (прямой) и AGGTCAAGACGAAGGATGGC (обратный). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Excel 2010» и программы Bio-Rad CFX Maestro. Различия считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ . Результаты анализа представляли в виде относительной нормализованной экспрессии в отн. ед. (относительно контрольного варианта для сорта «Эт W5»).

**Результаты и выводы.** С целью выявления взаимосвязи между способностью к накоплению антоцианов и экспрессией ряда структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов в качестве объекта исследования были отобраны два сорта озимой пшеницы, различающиеся по окраске колеоптилей и содержанию в них антоцианов: сорт «Эт W5» с красной окраской колеоптилей и высоким содержанием антоцианов ( $412 \pm 52$  мкмоль/г сырой массы) и сорт «Влади» с зеленой окраской колеоптилей и низким содержанием антоцианов ( $12,5 \pm 1,2$  мкмоль/г сырой массы).

**А**



**Б**

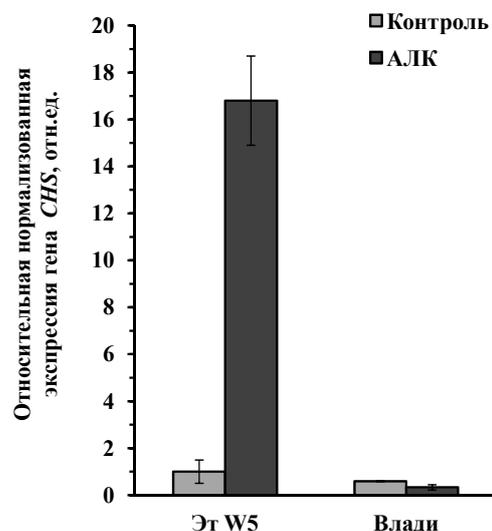


Рисунок – Влияние экзогенной АЛК в концентрации 50 мг/л на экспрессию генов *PAL* (А) и *CHS* (Б) в колеоптилях озимой пшеницы сортов «ЭтW5» и «Влади»

Ранее нами было показано, что при предварительном замачивании семян озимой пшеницы в растворе АЛК в концентрации 50 мг/л колеоптили проростков сорта «Эт W5» приобретали более интенсивное окрашивание ткани, что было обусловлено повышением содержания в них антоцианов в 1,5 раза по сравнению с контролем. Напротив, колеоптили растений сорта «Влади», семена которых обрабатывали АЛК, своей окраски не меняли, и содержание в них антоцианов оставалось низким – в среднем 22 мкмоль/г сырой массы [10].

В данной работе установлено, что в колеоптилях пшеницы сорта «Эт W5» под действием АЛК в 1,4 раза возрастает уровень относительной нормализованной экспрессии гена *PAL* и в 17 раз этот показатель возрастает для гена *CHS* по сравнению с уровнем экспрессии данных генов в колеоптилях растений контрольного варианта (рисунок). При этом в колеоптилях растений сорта «Влади» достоверных изменений под действием АЛК экспрессии генов *PAL* и *CHS* зафиксировано не было. Можно сделать вывод, что положительное действие экзогенной АЛК на экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов в колеоптилях пшеницы является сортоспецифичным и определяется начальным уровнем содержания антоцианов в данной ткани.

Далее мы изучили влияние экзогенной АЛК на экспрессию регуляторного гена *PAP-1*, кодирующего транскрипционный фактор PAP1/TaMYB75, который контролирует тканеспецифическую экспрессию структурных генов биосинтеза антоцианов. Результаты исследования показали, что уровень экспрессии *PAP-1* в колеоптилях пшеницы сорта «Эт W5», характеризующегося красной окраской колеоптилей, был в 20 раз выше, чем уровень экспрессии данного гена в колеоптилях сорта «Влади», характеризующегося зеленой окраской колеоптилей. Под действием экзогенной АЛК наблюдалась лишь тенденция к увеличению экспрессии *PAP-1* в колеоптилях растений сорта «Эт W5», при этом в колеоптилях растений сорта «Влади» экспрессию *PAP-1* детектировать не удалось.

Ранее в работе [8] на растениях озимого рапса Авериной Н.Г. с соавторами было показано, что экзогенная АЛК контролирует экспрессию структурного гена синтеза антоцианов *DFR*, кодирующего 4-дегидрофлавонолредуктазу, и регуляторного гена *HY5* транскрипционного фактора HY5. Отмеченное нами положительное действие экзогенной АЛК на экспрессию генов *PAL* и *CHS* в колеоптилях озимой пшеницы указывает на то, что АЛК влияет не только на экспрессию «поздних» структурных и регуляторных генов биосинтеза антоцианов, но и на экспрессию начальных структурных генов фенилпропаноидного и флавоноидного участков пути биосинтеза антоцианов.

*Исследования проводились при финансовой поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20ГРМГ-001).*

#### Список использованных источников

1. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review / Y. Wu [et al.] // Plant Growth Regulation. – 2019. – Vol. 87. – P. 357–374.
2. Wang, H. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins / H. Wang, G. Cao, R. L. Prior // J Agric Food Chem. – 1997. – Vol. 45, N 2. – P. 304–309
3. Молекулярно-генетические механизмы формирования окраски плодов и семян растений / В.Ф. Аджиева [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Vol. 19 (5). – P. 561–573.
4. Shoeva, O.Y. The specific features of anthocyanin biosynthesis regulation in wheat / O.Y. Shoeva, E.K. Khlestkina // Advances in wheat genetics: from genome to field : proceedings of the 12th International wheat genetics symposium. – 2015. – P. 147–157.
5. Shoeva, O.Y. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress / Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. // Cereal Research Communications. – 2018. – Vol. 46 (2). – P. 242–252.
6. Tereshchenko, O.Y. Relationship between anthocyanin biosynthesis and abiotic stress in wheat / O.Y. Tereshchenko [et al.] // In: A. Börner, B. Kobijlski (eds), Proc. 15th EWAC Conf. – 2011, Novi Sad. – P. 72–75.
7. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth / Y. Hotta [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1997. – Vol. 12. – P. 2025–2028.
8. Effect of 5-aminolevulinic acid and genistein on accumulation of polyphenol and anthocyanin in «Qinyang» apples / L. Chen [et al.] // J Anim Plant Sci. – 2015. – Vol. 25. – P. 68–79.
9. Молекулярно-генетические механизмы регуляции дигидрофлавонолредуктазы и транскрипционного фактора HY5 экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках озимого рапса / Н.

Г. Аверина [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 317–324.

10. Savina, S.M. «Induction of accumulation of anthocyanins by 5-aminolevulinic acid in winter wheat varieties with different coleoptile color» / S.M. Savina [et al.] // International Scientific Conference “Plants Stress and Adaptation”: The Bulletin of Kharkiv National Agrarian Universit. Series biology. – 2021. – P.156–157.

УДК 633.85:641

## ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ ПОДСОЛНЕЧНОГО ШРОТА

Л.И. Сапунова<sup>1</sup>, Л.В. Ерхова<sup>1</sup>, В.В. Горбань<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, [leonida@mbio.bas-net.by](mailto:leonida@mbio.bas-net.by)  
<sup>2</sup>ООО «СОЙТЭКС», Москва, Россия, [v.gorban@soytex.com](mailto:v.gorban@soytex.com)

Мировой рынок белка оценивается более чем в 1 трлн. долл. США, из которых доля кормового белка сегодня составляет 125 млрд. долл. (40 млн. т) и в 2024 г. достигнет 200 млрд. долл. Особенностью современных рационов животных является преобладание в них растительных источников протеина при дефиците белка животного происхождения. В настоящее время в составе комбикормов используют преимущественно соевый (до 30 %) и рапсовый (до 10 %) шрот. В качестве альтернативы рассматривается подсолнечный шрот: к 2024 г. его доля среди белковых продуктов только для объектов аквакультуры прогнозируется на уровне более 5 % [1].

Подсолнечный шрот с различной степенью отделения лузги получают из семян подсолнечника путем экстракции масла растворителями. Выпускают обычный (с частичным удалением лузги) и высокобелковый (с отделением основного количества лузги) шрот [2]. Содержание в последнем сырого протеина варьируется в пределах 44–50 % [3].

Подсолнечный шрот – это хороший источник протеина с доступностью аминокислот как у соевого шрота, и гораздо большей, чем у рапсового или хлопкового шрота. Следует, однако, отметить, что подсолнечный шрот дефицитен по лизину, что требует коррекции рациона животных дополнительным включением его синтетического аналога. Соотношение в нем аминокислот сильно изменяется при нагревании в процессе обработки: значительно снижается доступность аспарагиновой кислоты, аргинина, треонина, лейцина и триптофана, увеличивается содержание глутаминовой кислоты, серина и амина. Поэтому возможность снижения доступности многих аминокислот следует учитывать при использовании подсолнечного шрота в рационах моногастричных животных [4].

Подсолнечный шрот сходен с соевым по содержанию кальция, однако превосходит его по содержанию фосфора и витамина В. В его составе выявлены также токоферол, кальциферол, тиамин, ниацин, рибофлавин, холин, пантотеновая кислота, пиридоксин.

Преимуществом подсолнечного шрота является отсутствие тех антипитательных факторов, которые обнаруживаются в соевом, рапсовом и хлопковом шроте и ограничивают их использование в кормах. Однако в семенах и шроте подсолнечника присутствуют фенольные соединения, представленные преимущественно хлорогеновой кислотой, в меньшей степени – кофейной, коричной, кумаровой, феруловой, синаповой и гидроксibenзойной кислотами [5].

Хлорогеновая кислота, составляющая 43–73 % фенольных соединений подсолнечного шрота [6], а также хинная кислота рассматриваются как токсичные элементы, которые при их обычном содержании в шроте соответственно 1,56 и 0,48 % не оказывают токсического действия на организм животных. Однако более высокие концентрации хлорогеновой кислоты ингибируют трипсин и липазу, что ухудшает перевариваемость корма [7]. При этом разрушению до 43 % хлорогеновой кислоты и улучшению питательной ценности комбикормов, содержащих подсолнечный шрот, способствует его термообработка при 100–120 °С [8].

Таким образом, учитывая высокое содержание в подсолнечном шроте лузги, состоящей, в основном, из трудноперевариваемых пентозанов, клетчатки (целлюлозы), лигнина, актуальной является его комплексная глубокая переработка с акцентом на высокое качество получаемых белковых продуктов, минимизацию объемов образующихся отходов.

На содержание протеина в подсолнечном шроте и жмыхе негативно влияет высокое содержание клетчатки, которая в количестве 34–35 % содержится, в основном, в лузге. Считается, что кормовая ценность и переваримость всех питательных веществ корма обратно пропорциональны

концентрации в нем клетчатки. Нежелательно также и ее невысокое (< 15 %) содержание в рационах из-за физиологических функций. Известно, что клетчатка придает рыхлость кормовой массе, играет роль раздражителя стенок кишечника, и, главное, является источником образования в желудках уксусной кислоты, которая служит предшественником молочного жира. В частности, для лактирующих коров оптимальный уровень сырой клетчатки в кормах составляет 17–22 % [9, 10].

На перерабатывающих предприятиях полное удаление лузги для снижения содержания клетчатки в шроте не практикуется. Это связано с увеличением потерь маслосодержащих тканей семян подсолнечника и, соответственно, снижением выхода масла, получаемого по существующим в настоящее время технологиям [11].

Для снижения содержания лузги в шроте или жмыхе подсолнечника проводят максимальное ее удаление на стадиях обрушивания семян и разделения рушанки. Например, из стандартного подсолнечного шрота путем механического удаления основной (более 80 %) части лузги получают продукт с высоким уровнем сырого протеина (42–46 %) и низким содержанием клетчатки (8–12 %) [7].

Продукт с высоким содержанием протеина и минимальными примесями оболочек семян [12] или лузги [13] получают путем измельчения шрота/жмыха подсолнечника и фракционирования частиц по размеру. Высококачественный корм (сырой белок > 40 %, сырая клетчатка < 10 %), который по питательной ценности сопоставим с экстракционным соевым шротом, получают дополнительным механическим структурированием грубых частиц шелухи за счет расщепления на волокна и частицы, измельчением и фракционированием [14].

Таким образом, при механической обработке стандартного [15] подсолнечного шрота образуются две фракции: одна – с максимальным накоплением клетчатки и минимальным содержанием протеина, другая – тонкоизмельченная однородная масса подсолнечного отсева с высоким содержанием протеина, которая практически не содержит волокнистой лузги. Выход последней фракции варьируется в пределах 55–65 % по массе, что дает возможность получить из подсолнечного шрота белковый концентрат с выходом до 70 %. Кормовые продукты, полученные дополнительной механической обработкой шрота подсолнечника, могут рассматриваться в качестве адекватной альтернативы сое [16].

Экономически более целесообразными формами белковых продуктов пищевого и кормового назначения являются концентраты и изоляты растительных белков с обезличенным вкусом и запахом, что позволяет использовать их в больших дозировках [17].

Существует три основных метода получения концентрата белка растительного происхождения: водное выщелачивание, спиртовая и кислотная экстракция небелковых компонентов масличных семян [18].

В процессе водного выщелачивания, которое является простейшим способом получения белкового концентрата, используют измельченное в муку сырье, подвергнутое термической обработке для денатурации белка. Обычно концентрация диспергируемого в воде белка составляет менее 15 % от его общего содержания в сырье. При этом в раствор помимо белка переходят углеводы, красящие и вкусовые вещества, витамины, минеральные соединения, другие растворимые в воде соединения. Получаемый продукт абсорбирует воду и жир, и его применение обычно ограничивается случаями, когда функциональные свойства не имеют особого значения.

Экстракция небелковых компонентов водным (70%) раствором спирта позволяет, в отличие от водной промывки, получить концентраты белка более светлого цвета без изменения их функциональных свойств.

Методом кислотной обработки растительного сырья получают концентраты белка с гораздо большей функциональной ценностью. В этом случае сырье промывают кислым раствором (обычно pH 4,0–4,5), соответствующим изоэлектрической точке белка, что при его минимальной потере позволяет максимально удалить небелковые компоненты [18].

Особо следует подчеркнуть, что экстракция белковых соединений шрота в щелочных условиях приводит к образованию окисленных производных фенольных соединений, придающих изолятам белка серую, серо-зеленую окраску и ухудшающих потребительские свойства продукта. Реализацию процесса в более мягких условиях, исключающих образование окрашенных соединений, обеспечивает ферментативный гидролиз растительного сырья [19].

Наиболее эффективным способом увеличения концентрации протеина, повышения его питательной ценности, перевариваемости и усвояемости представляется использование микробных и/или ферментных технологий.

Предложен способ получения биологически активной кормовой добавки, который предусматривает измельчение растительного сырья (шелухи семян подсолнечника, гречихи, проса, овса, рапса) до размера частиц  $\leq 1$  мм (60–85 %); отбор культур бактерий из пищеварительного тракта (ротовой полости, зоба, преджелудка, кишечника) или экскрементов растительоядных животных; получение посевного материала; твердофазную или жидкофазную микробную ферментацию указанного целлюлозосодержащего сырья в факультативно-анаэробных условиях при температуре 18–70 °С в течение 5–48 ч до достижения в ферментационной среде определенной величины целлюлазной активности (не менее 90 ед/г сухого продукта). Ферментацию проводят монокультурой, ассоциацией микроорганизмов или комплексом, состоящим из ассоциации микроорганизмов и, по крайней мере, одного дополнительного штамма из числа микроорганизмов, относящихся к родам *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Ruminococcus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium* [20].

Способ получения кормового продукта с повышенным содержанием белка включает измельчение и суспендирование подсолнечного шрота в воде; ферментативный гидролиз суспензии, обеспечивающий разрушение клетчатки шрота до моносахаров; внесение в полученную питательную среду дрожжей рода *Saccharomyces* и их размножение; инактивацию дрожжевых клеток и сопутствующей микрофлоры термическим способом; сушку полученного продукта [21].

Описан способ получения кормового продукта с повышенным содержанием белка путем обогащения подсолнечного шрота белком гриба-ксилофита [22]. Способ заключается в разрыхлении и стерилизации подсолнечного шрота пропариванием до температуры не менее 50 °С, его инокуляции мицелием гриба-ксилофита (1–4 % от массы шрота), выращивании гриба в нестерильных условиях до образования примордий, тепловой инактивации мицелия для уничтожения посторонней микрофлоры и сушки полученного продукта.

При получении ферментативного гидролизата сырье (шрот или жмых масличного сырья, включая подсолнечник) влажностью 10–30 % экструдуют при 90–180 °С, после чего экструдат обрабатывают ферментами протеолитического и/или целлюлолитического и/или альфа-галактозидазного действия [23].

Обезжиренный подсолнечный шрот, ферментированный с использованием молочнокислых бактерий, отличается от исходного сырья повышенной растворимостью белка, уменьшенным содержанием хлорогеновой кислоты, фенольного пигмента, ответственного за потемнение шрота, отсутствием несбраживаемых сахаров (раффинозы) и более высоким содержанием лизина – основной ограничивающей аминокислоты подсолнечника. Ферментированный подсолнечный шрот может найти применение при производстве хлеба и другой выпечки, при изготовлении обогащенных белком закусок, в рецептурах диетических продуктов с улучшенным составом питательных веществ [24].

Для получения модифицированного белкового изолята из подсолнечного жмыха после предварительного измельчения, обезжиривания и отделения семенной оболочки экстрагируют, а затем осаждают белок. После промывки водой проводят двухступенчатый ферментативный гидролиз белкового изолята, сначала протеазами подсырной молочной сыворотки (10 : (1–2), вес/вес; 35–37 °С, 30–35 мин), а затем протеазами из пророщенных семян подсолнечника (3 : (1–2), вес/вес; 25–35 °С, 40–45 мин). Затем изолят модифицированного белка подвергают термической обработке при 80–90 °С в течение 5–10 мин, сушат при 40–45 °С в течение 20–24 ч до влажности 7–8 % [25].

Для повышения выхода белка на стадии его экстракции из обезжиренного шрота подсолнечника предлагается использование ферментных препаратов Protex 40E, Protex 6L, Protex 51FP и Protex 7L [26], а также трипсина в нейтральном или слабощелочном растворе хлорида натрия [27].

В целом, использование микроорганизмов для обработки подсолнечного шрота сопровождается увеличением содержания в конечном продукте белка, характеризующегося сбалансированным аминокислотным составом и, значит, более высокой питательной ценностью и усвояемостью, улучшенными функционально-технологическими свойствами при интенсификации и упрощении как самого процесса, так и его машинно-аппаратурного оформления [21–23].

Таким образом, анализ научно-технической и патентной информации показывает, что повысить питательную ценность подсолнечного шрота и полученных из него белковых изолятов позволяют механическое удаление лузги; химическая, микробная, ферментативная обработка и/или их сочетанное воздействие. Наиболее перспективным способом увеличения концентрации белка и незаменимых аминокислот представляется микробная обработка подсолнечного шрота, возможно, в сочетании с ферментативным воздействием на содержащиеся в нем трудногидролизуемые высокомолекулярные компоненты.

### Список использованных источников

1. Вопросы производства и использования белков : материалы международных форумов «ПротеинТек» и «ПроПротеин», Москва, 26–27 сентября 2018 г. / Комбикорма. – 2018. – № 11. – С. 13–16.
2. Алихаев, В.А. Справочник по контролю кормления и содержания животных / В.А. Алихаев, Е.А. Петухова, Л.Д. Халенова. – М.: Колос. – 1982. – 308 с.
3. Шванская, И.А. Использование отходов перерабатывающих отраслей в животноводстве. Научно-аналитический обзор / И.А. Шванская, Л.Ю. Коноваленко // Москва: Росинформагротех, 2011. – 96 с.
4. Антипитательные факторы продуктов переработки подсолнечника [Электронный ресурс] // <http://ait-magazine.com.ua/sites/default/files/pictures/edinstvo.pdf>
5. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel / S. Žilić [et al.] // *Helia*. – 2010. – Vol. 33, № 52. – P. 75–84.
6. Обоснование получения хлорогеновой кислоты из подсолнечного шрота / И.Е. Шаповалова [и др.] // *Восточно-Европейский журнал передовых технологий*. – 2013. – Т. 3, № 6 (63). – С. 39–41.
7. Федоров, Ю. Высокопротеиновый подсолнечный шрот в рационе бройлеров / Ю. Федоров, В. Манукян, Е. Байковская // *Комбикорма*. – 2019. – № 9. – С. 50–52.
8. Евтушенко, С.Л. Влияние качественных показателей сырья и технологического процесса на содержание протеина в семенах подсолнечника и продуктах его переработки / С.Л. Евтушенко // *Вестн. Нац. техн. ун-та «ХПИ» : сб. науч. тр. Темат. вып. : Новые решения в современных технологиях*. – Харьков, 2008. – № 3. – С. 89–97.
9. Корма Республики Татарстан: состав, питательность и использование : справочник / Л.П. Зарипова [и др.]. – 3-е изд., перераб., дополн. – Казань : Изд-во Академии наук РТ, 2010. – 372 с.
10. Анализ питательной ценности растительных кормов и вторичного сырья / Р.А. Шурхно [и др.] // *Вестн. Казан. техн. ун-та*. – 2014. – Т. 17, № 21. – С. 223–228.
11. Марков, С.А. Особенности химического состава фракций подсолнечных жмыхов и шротов при их безреагентном разделении / С.А. Марков, А.И. Петенко // *Известия вузов. Пищевая технология*. – 2012. – № 1. – С. 29–31.
12. Способ удаления оболочек семян из шрота/жмыха подсолнечника и установка для его осуществления : пат. RU 2268629 (C2) / А.Б. Петров. – Оpubл. 27.01.2006.
13. Способ доработки подсолнечного шрота и установка для его осуществления : пат. RU 2617597 (C2) / В.В. Васько. – Оpubл. 25.04.2017.
14. Способ и установка для переработки экстракционного шрота из семян подсолнечника для кормления животных : пат. RU 2297155 / У. Вальтер. – Оpubл. 20.07.2007.
15. Шрот подсолнечный. Технические условия : ГОСТ 11246-96. – Взамен ГОСТ 11246-65 ; введ. РБ 01.10.97. – Госстандарт РБ, 1997. – 18 с.
16. Подобед, Л. Концентрат подсолнечного шрота в рационе свиней / Л. Подобед, Л. Кузьменко // *Комбикорма*. – 2012. – № 8. – С. 85–86.
17. Щеколдина, Т.В. Технологии получения белоксодержащего сырья из продуктов переработки семян подсолнечника / Т. В. Щеколдина // *Научный журнал КубГАУ*. – 2015. – №109(05). – С. 360–378.
18. Получение пищевых белковых продуктов из семян и шротов подсолнечника и их использование / В.В. Карабутов [и др.] // *Вестн. Нац. техн. ун-та «ХПИ» : сб. науч. тр. Темат. вып. : Новые решения в современных технологиях*. – Харьков, 2008. – № 43. – С. 9–13.
19. Романова, А.Б. Получение белковых ферментоллизатов шрота подсолнечника / А.Б. Романова, Е.А. Самарина, Д.В. Баурин // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2013. – Т. 27, № 9. – С. 11–14.
20. Способ получения биологически активной кормовой добавки из растительного сырья : пат. RU 2202224 / Н.А. Ушакова, Е.И. Наумова, Д.С. Павлов, Б.А. Чернуха. – Оpubл. 20.04.2003.
21. Способ получения кормового продукта с повышенным содержанием белка путем обогащения подсолнечного шрота белком дрожжей сахаромикетов : пат. RU 2561535 (C1) / С.В. Кислов. – Оpubл. 27.08.2015.
22. Способ получения кормового продукта с повышенным содержанием белка путем обогащения подсолнечного шрота белком гриба-ксилофита : пат. RU 2562197 (C1) / С.В. Кислов. – Оpubл. 10.09.2015.

23. Способ получения гидролизата из шротов и жмыхов масличных культур : пат. RU 2631827 (C1) / А.Ю. Шариков, А.С. Серeda, В.И. Степанов, В.В. Иванов, Е.В. Костылева, И.А. Великорская, Н.В. Цурикова. – Оpubл. 26.09.2017.

24. Fermented sunflower meal and the method for its preparation : pat. CA 1204401A / M. Canella, A. Bernardi, D. Marghinotti, G. Sodini. – Publ. date 13.05.1986.

25. Способ получения модифицированного белкового изолята из подсолнечного жмыха : пат. RU 2483565 (C2) / Н.С. Безверхая, Н.В. Ильчишина. – Оpubл. 10.06.2013.

26. Баурин, Д.В. Комплексная технология переработки шрота подсолнечника с получением изолята белка и углеводно-белкового корма : дис. ... канд. техн. наук : 03.01.06 / Д.В. Баурин. – Москва, 2014. – 196 с.

27. Способ получения белковых изолятов из подсолнечного шрота : пат. UA 12489 U / Т.Т. Носенко. – Оpubл. 15.02.2006.

УДК 575.222.73:576.354.4

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМОТИПА У СТАБИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А.В. Соколюк, М.Е. Василевская

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

**Введение.** Создание тритикале ( $\times$  *Triticale*) является примером наиболее успешного применения отдаленной гибридизации и экспериментальной полиплоидии в селекции зерновых культур. Современный генофонд пшенично-ржаных гибридов включает искусственно синтезированные тетраплоидные (*Triticosecale tetraploidii (lebedevii)* Kurk.; A/BRR,  $2n=4x=28$ ), гексаплоидные (*Triticosecale hexaploidii (derzhavinii)* Kurk. et Filat.; AABBRR,  $2n=6x=42$ ) и октоплоидные (*Triticosecale rimpaii* Wittm.; AABBDDRR,  $2n=8x=56$ ) тритикале, а также хромосомно-замещенные формы, в том числе с генетическим материалом диких видов злаков. На сегодняшний день только гексаплоидные тритикале в полной мере отвечают требованиям сельскохозяйственного производства, тогда как тетраплоидные и октоплоидные формы используются в основном в работах по хромосомной реконструкции полигенома пшенично-ржаных гибридов. Принимая во внимание синтетическую природу тритикале и отсутствие естественных центров формообразования, дальнейшее развитие селекционной работы с этой культурой ставит вопрос о необходимости расширения спектра доступной отбору генетической изменчивости за счет вовлечения в скрещивания видового и сортового разнообразия пшеницы и ржи, создания новых амфидиплоидов различного генетического состава и ядерно-цитоплазматической структуры (на цитоплазме пшеницы или ржи).

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в результате многолетних исследований по отдаленной гибридизации и хромосомной инженерии создан разнообразный генофонд пшенично-ржаных гибридов, характеризующихся различиями по структуре ядерного полигенома и происхождению цитоплазмы (Гордей и др., 2020). В настоящей работе поставлена задача с применением молекулярно-генетических методов провести идентификацию плазмоти́па у стабильных линий пшенично-ржаных амфидиплоидов с целью дальнейшего использования форм с различной ядерно-цитоплазматической структурой для научных исследований и практической селекции.

**Материалы и методы.** Объектами исследования являлись:

– 11 стабильных линий вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале с интрогрессией хромосом D-генома пшеницы (A/B/DRR,  $2n=6x=42$ ), полученных путем гибридизации первичных рекомбинантных линий с современными сортами тритикале (Дубовец и др., 2013);

– 14 стабильных высокопродуктивных линий секалотритикум F<sub>6-16</sub> поколений (*Secalotriticum*, S<sup>r</sup>/RRAABB,  $2n=6x=42$ ), полученных в результате гибридизации тетраплоидной ржи с гексаплоидными тритикале и последующего однократного беккрасса на тритикале полученных пентаплоидных ржано-тритикальных гибридов F<sub>1</sub> (Гордей, Люси́ков и Гордей, 2020);

– 9 стабильных линий тетраплоидных тритикале (A/BRR,  $2n=4x=28$ ), выделенных в потомстве от скрещивания гексаплоидных тритикале с диплоидной рожью (Дубовец и др., 2010).

Выделение тотальной ДНК осуществлялось с помощью набора Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit.

Изучение тотальной ДНК проводилось с помощью ПЦР со специфическими праймерами к 18S/5S митохондриальному (мт) повтору и *ndhH*-району хлоропластной (хп) ДНК. ПЦР проводи-

лась в смеси следующего состава: 250 мкМ каждого из dNTP; 1 мкМ каждого праймера, 2мМ MgCl<sub>2</sub>, 1U TaqДНК-полимеразы (ArtBioTech), 1xPCR буфер (ArtBioTech), 100-200 нг тотальной ДНК с использованием амплификатора Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler.

Для амплификации *18S/5S* мт-повтора были использованы прямой праймер с нуклеотидной последовательностью – 5'-TTCTCGCGTTCCCTTAATTC-3'; обратный праймер с нуклеотидной последовательностью – 5'-CGTTCGCCACTTTGTTCTCA-3'. Оптимальными условиями для проведения амплификации являются: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация – 92 °С, 30 сек; отжиг – 55 °С, 1 мин; элонгация – 72 °С, 1 мин; заключительная достройка – 72 °С, 10 мин.

Для амплификации *ndhH*-района хпДНК были использованы следующие праймеры: прямой – 5'-TGCATGGTGTTCTTCGACTG-3'; обратный – 5'-GGATTCCTCATTTACCAAC-3'. Оптимальными условиями для проведения амплификации являются: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация – 94 °С, 45 сек; отжиг – 60 °С, 1 мин; элонгация – 72 °С, 1 мин; заключительная достройка – 72 °С, 10 мин.

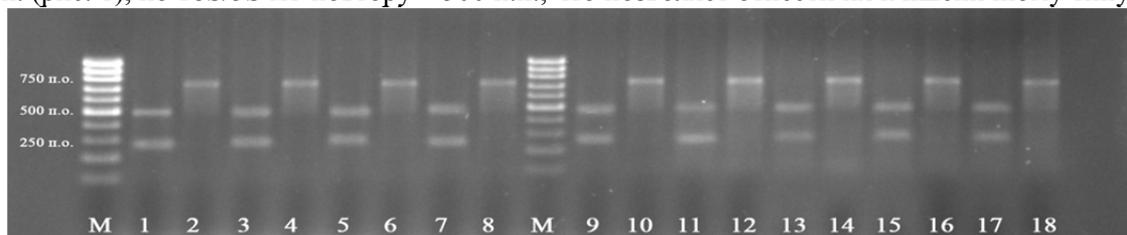
Детекция принадлежности локусов органелльной ДНК к пшеничному или ржаному типу проводилась с помощью рестрикционного анализа ПЦР-продуктов: *18S/5S* мт-повтор анализировался с использованием эндонуклеазы рестрикции *Sal I*, *ndhH*-район хлоропластной ДНК анализировался с использованием эндонуклеазы рестрикции *Msp I*.

Продукты ПЦР и рестрикции фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×ТАЕ буфере в течение 90 минут при напряжении 80В. Результат документировался в системе гель документации Biorad Gel Doc XR+.

**Результаты.** Из литературных данных известно, что в зависимости от происхождения пшенично-ржаные гибриды могут содержать различные родительские типы митохондриальной (мт) и хлоропластной (хп) ДНК, при этом в некоторых случаях наблюдается явление гетероплазмии, когда у одного растения присутствуют более одного варианта хпДНК и/или мтДНК (Трубачеева и др., 2012). Установлено, что гетероплазмия у гибридных форм может затрагивать одновременно несколько локусов органелльной ДНК и сохраняться в ряду самоопыленных поколений (Hattori et al., 2002).

Детектировать различия между органелльной ДНК пшеницы и ржи можно на основании ПЦР-ПДРФ анализа *ndhH*-района хлоропластной ДНК (имеет сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *MspI*) и *18S/5S*-повтора митохондриальной ДНК (имеет сайт узнавания эндонуклеазы *SalI*). Плазматипу ржи соответствует отсутствие рестрикции амплифицированного участка *ndhH* эндонуклеазой *MspI* (фрагмент 750 п.н.) и наличие рестрикции *tMet-18S/5S*-локуса эндонуклеазой *SalI* (фрагменты 250 п.н.), а плазматипу пшеницы – рестрикция амплифицированного участка *ndhH* эндонуклеазой *MspI* (фрагменты длиной 500 и 250 п.н.) и отсутствие рестрикции *tMet-18S/5S*-локуса эндонуклеазой *SalI* (фрагмент 500 п.н.).

В результате рестрикционного анализа у всех исследованных линий вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале по *ndhH*-району хпДНК были получены фрагменты длиной 500 и 250 п.н. (рис. 1), по *18S/5S* мт-повтору – 500 п.н., что позволяет отнести их к пшеничному типу.



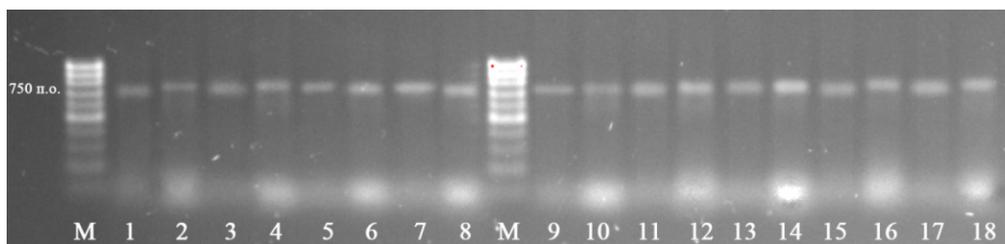
**Рисунок 1. – Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов по *ndhH*-району хпДНК у линий гексаплоидных тритикале**

М - Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder)

2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – ПЦР-продукт *ndhH*-района; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 – результат рестрикции ПЦР-продукта *ndhH*-района.

Аналогичные результаты получены для тетраплоидных тритикале.

У всех исследованных линий секалотритикале по *ndhH*-району хлоропластной ДНК были получены фрагменты длиной 750 п.н. (рис. 2), по *18S/5S*-повтору митохондриальной ДНК – 250 п.н. Это свидетельствует о принадлежности данных районов к ржаному типу.



**Рисунок 2.** – Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов по *ndhH*-району хпДНК у линий секалотритикум

М – Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder)  
2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – ПЦР-продукт *ndhH*-района; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 – результат рестрикции ПЦР-продукта *ndhH*-района.

**Выводы.** В ходе молекулярно-генетического анализа в коллекции стабильных линий пшенично-ржаных амфидиплоидов выявлены формы с различной ядерно-цитоплазматической структурой. Полученные результаты позволили идентифицировать районы органелльных ДНК ржаного типа в гомоплазматическом состоянии у линий секалотритикум и пшеничного типа в гомоплазматическом состоянии у линий тетраплоидных и вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале. Гетероплазматического состояния исследованных локусов митохондриальной и хлоропластной ДНК выявлено не было.

#### Список использованных источников

1. Гордей И.А., Люсиков О.М., Белько Н.Б., Хотылева Л.В., Каминская Л.Н., Корень Л.В., Орловская О.А., Дубовец Н.И., Сычева Е.А. Соловей Л.А., Бондаревич Е.Б., Гриб С.И., Буштович В.Н. (2020). Тритикале. *Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений.* под ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева; Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. 2-е издание, испр., перераб. и доп. Минск: Беларуская наука, 2020. С. 52-154.
2. Гордей И.А., Люсиков О.М., Гордей И.С. (2020). *Технология создания ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум: методические рекомендации.* Минск: Право и экономика. 34 с.
3. Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б. (2013). Создание и молекулярно-цитогенетическое маркирование вторичных хромосомно-замещенных форм гексаплоидных тритикале (*×Triticosecale* Wittm.). *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 4. С. 35-44.
4. Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б., Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е. (2010). Создание генетической коллекции тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов и её использование в цитогенетических исследованиях. Сборник научных трудов Института генетики и цитологии НАН Беларуси «Молекулярная и прикладная генетика». 11. С. 26-33.
5. Трубачеева Н.В., Кравцова Л.А., Девяткина Э.П., Ефремова Т.Т., Синявская М.Г., Шумный В.К., Першина Л.А. (2012). Гетеро- и гомоплазматическое состояние районов митохондриальной и хлоропластной ДНК у потомков отдаленных гибридов мягкой пшеницы разного происхождения. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 16 (1). С. 160-169.
6. Hattori N., Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. (2002). Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus cytoplasm hybrids. *Genetics.* 160 (4). P. 1619–1630.

УДК 606.636/639

### БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ КАК МАРКЕРЫ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

**В.И. Халак**

*Институт зерновых культур НААН Украины, Днепр, Украина, v16kh91@gmail.com*

Теоретической основой для проведения исследований является научные разработки отечественных и зарубежных ученых [1-7].

**Цель работы** – изучить биохимических показателей сыворотки крови, физико-химических свойств и химического состава мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы, а также определить уровень корреляционных связей между указанными признаками.

**Материал и методы исследований.** Исследования проведены в агроформированиях Днепропетровской области, ООО «Глобинский мясокомбинат» Полтавской области, лаборатории зоохимического анализа Института свиноводства и АПП НААН Украины, лаборатории животноводства Государственного учреждения «Институт зерновых культур НААН Украины» и научно-исследовательском центре биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК Днепропетровского государственного аграрно-экономического университета.

Активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ) и щелочной фосфатазы в сыворотке крови молодняка свиней 145-150 дневного возраста определяли по методикам В. В. Влизло и другие [8].

Физико-химические свойства и химический состав мышечной ткани молодняка свиней изучали с учетом следующих показателей: активная кислотность (рН), единиц кислотности; нежность, с; влагоудерживающая способность, %; интенсивность окраски, ед. экст.×1000; содержание (%): общей влаги, сухого вещества, золы, протеина, жира, кальция и фосфора [9].

Биометрическую обработку полученных данных проводили по методикам Лакина Г. Ф. [10].

**Результаты исследований.** Установлено, что биохимические показатели сыворотки крови молодняка свиней крупной белой породы соответствуют физиологической норме клинически здоровых животных (табл. 1).

Таблица 1. – Биохимические показатели сыворотки крови молодняка свиней крупной белой породы, n=25

Показатели, единицы измерения	Биометрические показатели	
	$\bar{X} \pm S \bar{x}$	$Cv \pm Sc_v, \%$
Активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ), ммоль/год/л	1,33±0,073	27,06±3,827
Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), ммоль/год/л	1,87±0,063	16,57±2,343
Активность щелочной фосфатазы, ед./л	291,99±12,516	21,43±3,031

Результаты исследований физико-химических свойств и химического состава мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы приведены в таблице 2.

Анализ лабораторных данных свидетельствует, что влагоудерживающая способность мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы составляет 60,01 %, активная кислотность через 24 часа после убоя – 5,62 единиц кислотности, нежность – 9,41 с, интенсивность окраски – 73,60 ед. экст.×1000 (табл. 2).

В образцах мышечной ткани содержится 74,13 % общей влаги, 27,25 % сухого вещества, золы – 1,13 %, протеина – 22,36 %, жира – 2,28 %, кальция – 0,045 %, фосфора – 0,126 %.

Коэффициент изменчивости биохимических показателей сыворотки крови, физико-химических свойств и химического состава мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы варьирует от 2,54 до 74,72 %.

Таблица 2 – Физико-химические свойства и химический состав мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы, n=25

Показатели, единицы измерения	Биометрические показатели	
	$\bar{X} \pm S \bar{x}$	$Cv \pm Sc_v, \%$
Активная кислотность (рН), единиц кислотности	5,62±0,028	2,54±0,359
Нежность, с	9,41±0,283	15,04±2,127
Влагоудерживающая способность, %	60,01±0,981	8,17±1,155
Интенсивность окраски, ед. экст.×1000	73,60±2,147	14,59±2,063
Содержание, %: общей влаги	74,13±0,446	3,01±0,425
сухого вещества	27,25±0,450	8,26±1,168
золы	1,13±0,019	8,51±1,203
протеина	22,36±0,400	8,95±1,265
жира	2,28±0,341	74,72±10,568
кальция	0,045±0,0011	12,37±1,749
фосфора	0,126±0,0047	18,67±2,640

Результаты расчета коэффициентов парной корреляции между биохимическими показателями

сыворотки крови, физико-химическими свойствами и химическим составом мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Коэффициенты парной корреляции между биохимическими показателями сыворотки крови, физико-химическими свойствами и химическим составом мышечной ткани молодняка свиней крупной белой породы, n=25

Количественные признаки		Биометрические показатели	
<i>x</i>	<i>y</i>	$r \pm S_r$	$t_r$
Активная кислотность (рН), единиц кислотности	<i>a</i>	0,165±0,2057	0,80
	<i>б</i>	0,443±0,1869*	2,37
	<i>в</i>	-0,018±0,2085	0,09
Нежность, с	<i>a</i>	-0,104±0,2074	0,50
	<i>б</i>	-0,174±0,2053	0,85
	<i>в</i>	0,105±0,2074	0,51
Влагоудерживающая способность, %	<i>a</i>	0,066±0,2081	0,32
	<i>б</i>	0,013±0,2085	0,06
	<i>в</i>	-0,120±0,2070	0,58
Интенсивность окраски, ед. экст.×1000	<i>a</i>	0,301±0,1988	1,51
	<i>б</i>	0,283±0,2000	1,42
	<i>в</i>	-0,483±0,1826*	2,65
Содержание, %: общей влаги	<i>a</i>	0,225±0,2032	1,11
	<i>б</i>	-0,184±0,2050	0,90
	<i>в</i>	-0,051±0,2082	0,24
сухого вещества	<i>a</i>	-0,173±0,2054	0,84
	<i>б</i>	0,208±0,2040	1,02
	<i>в</i>	0,022±0,2085	0,11
зола	<i>a</i>	-0,027±0,2084	0,13
	<i>б</i>	0,012±0,2085	0,06
	<i>в</i>	0,135±0,2066	0,65
протеина	<i>a</i>	0,026±0,2084	0,12
	<i>б</i>	0,126±0,2069	0,61
	<i>в</i>	0,118±0,2071	0,57
жира	<i>a</i>	-0,292±0,1994	1,46
	<i>б</i>	0,084±0,2078	0,40
	<i>в</i>	-0,116±0,2071	0,56
кальция	<i>a</i>	-0,030±0,2084	0,14
	<i>б</i>	0,124±0,2069	0,60
	<i>в</i>	-0,140±0,2065	0,68
фосфора	<i>a</i>	0,178±0,2052	0,87
	<i>б</i>	0,392±0,1918	2,04
	<i>в</i>	-0,484±0,1825*	2,65

Примечание – а – активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ), ммоль/год/л; б – активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), ммоль/год/л; в – активность щелочной фосфатазы, ед./л; \* –  $p \leq 0,05$

Установлено, что данный биометрический показатель варьирует от -0,484 до +0,443, а достоверные значения установлены между следующими парами признаков: активная кислотность (рН) × активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) (+0,443±0,1869;  $t_r=2,37$ ), интенсивность окраски × активность щелочной фосфатазы (-0,483±0,1826;  $t_r=2,65$ ), содержание фосфора × активность щелочной фосфатазы (-0,484±0,1825;  $t_r=2,65$ ).

**Закключение.** Установлено, что биохимические показатели сыворотки крови молодняка свиней крупной белой породы соответствуют физиологической норме клинически здоровых животных. Количество достоверных корреляционных связей между биохимическими показателями сыворот-

ки крови, физико-химическими свойствами и химическим составом мышечной ткани молодняка свиной крупной белой пород составляет 9,09 %. Перспективными биохимическими показателями сыворотки крови для раннего прогнозирования качественных показателей мышечной ткани молодняка свиной являются активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и щелочной фосфатазы.

#### Список использованных источников

1. Баньковська І. Б. Комплексний вплив факторів породи, статі та живої маси на показники м'ясної продуктивності свиной / І. Б. Баньковська // Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Тваринництво. – 2016. – Вип. 7. – С. 36–42.
2. Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs / M. M. Franco [et al.] // J. Appl. Genet. 2005. Vol. 46(2). P. 195–200.
3. Khalak, V., Gutyj, B., Bordun, O., Pchenko, M., Horchanok, A. Effect of blood serum enzymes on meat qualities of piglet productivity. Ukrainian Journal of Ecology, 2020. 10 (1), 158–161. (doi: 10.15421/2020\_25).
4. Волощук В. М., Гетья А. А., Церенюк О. М. Вивчення м'ясної продуктивності свиной. Методологія та організація наукових досліджень у тваринництві: посібник / В. М. Волощук, А. А. Гетья, О. М. Церенюк; за ред. І. І. Ібатуліна, О. М. Жукорського // Київ: Аграрна наука, 2017. – С. 124–129.
5. Церенюк О. М. Відгодівельні якості молодняка свиной з різною стресостійкістю в період «кризи відлучення» / О. М. Церенюк // Аграрний вісник Причорномор'я. – 2014. – Вип. 71-2. – С. 75–78.
6. Березовский Н. Д., Онищенко А. А. Интерьерные показатели продуктивности чистопородных и гибридных свиной / Н. Д. Березовський, А. А. Онищенко // Современные проблемы интенсификации производства свинины: сб. науч. тр. – Ульяновская государственная с.-х. академия. Ульяновск, 2007. – Т.1: Разведение, селекция, генетика и воспроизводство свиной. – С. 313–315.
7. Халак В. І., Грабовська О. С. Комплексна оцінка відгодівельних і м'ясних якостей молодняка свиной універсального напряму продуктивності та деякі їх інтер'єрні особливості / В. І. Халак, О. С. Грабовська // Наук.-техн. бюл. Держ. наук.-досл. контрольного ін-ту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Ін-ту біології тварин. – Львів, 2020. – Вип. 21. – № 2. – С. 205–212. doi: 10.36359/scivp.2020-21-2.27.
8. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло та ін.; за ред. В. В. Влізло // Львів: СПОЛОМ, 2012. – 767 с.
9. Поливода А. М., Стробыкина Р. В., Любецкий М. Д. Методика оценки качества продуктов убоя у свиной / А. М. Поливода, Р. В. Стробыкина, М. Д. Любецкий // Методики исследований по свиноводству. – Харьков, 1977. – С. 48–56.
10. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин // Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с.

УДК 636.52/58:575.17

#### ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ГОРМОНА РОСТА У КУР И ПЕТУХОВ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Е.В. Халимончик<sup>1</sup>, О.А. Епишко<sup>2</sup>, Н.М. Юрага<sup>2</sup>, Е.С. Чебуранова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Беларусь

<sup>2</sup>Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Беларусь

К настоящему времени структура ДНК домашней курицы считается полностью расшифрованной. Существует несколько баз данных, где можно получить информацию об отдельных генах, структуре повторяющихся последовательностей, однонуклеотидных заменах и много другой полезной информации.

Открытие и последующее использование для анализа полиморфных ДНК-фрагментов, позволило получить данные о гетерогенности различных пород и популяций сельскохозяйственной птицы. На основе этих работ были сделаны выводы о происхождении разных групп кур, построены дендрограммы генетического сходства и определены генетические расстояния между популяциями.

Современные исследования направлены на поиск различных вариантов полиморфизма, которые могут оказаться связанными с хозяйственно-полезными признаками. У кур это особенно акту-

ально, поскольку для них характерна быстрая смена поколений. Это дает селекционеру шанс получить эффект селекции в течение незначительного времени, если вести отбор по генам-кандидатам важных признаков. К числу наиболее перспективного гена-кандидата в яичном птицеводстве относится ген гормона роста.

Гормон роста относится к классу пептидных гормонов с широким спектром регулируемых функций. Он принимает непосредственное участие в регуляции роста и дифференцировки различных типов тканей организма.

Ген гормона роста (GH), расположенный в 27-й хромосоме, содержит 5 экзонов, 4 интрона. Показано наличие различных SNP (G662A, T3094C, C3199T и т.д.) в разных участках гена (интроны, экзоны и т.д.). Выявлена связь аллельных вариантов с продуктивными признаками (яичная и мясная продуктивность). Отмечена позитивная корреляция SacI+ аллеля (4-й интрон) с показателями резистентности к болезни Марека, в свою очередь MspI полиморфизм в 1-м интроне связан с яичной продуктивностью птицы.

Целью настоящего исследования является изучение полиморфизма гена гормона роста (GH) у кур и петухов отечественной селекции с использованием молекулярно-генетической дифференциации.

Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» Учреждения образования «Гродненский государственный аграрный университет».

Биологическим материалом для исследований служила кровь кур и петухов исходных линий яичных кур: K1, K3 и K4. Отобрано 241 проба крови от птицы. Кровь отбирали из гребня с помощью скарификатора на стерильную фильтровальную бумагу. Выделение ДНК осуществляли перхлоратным методом с двойной дополнительной очисткой.

Полиморфизм гена гормона роста (GH1) определяли по первому интрону с помощью рестрикционного анализа с использованием MspI.

Для амплификации участка гена GH1 использовали праймеры:

-5'-ATCCCCAGGCAAACATCCTC-3'

-5'-CCTCGACATCCAGCTCACAT-3'

ПЦР-программа: «горячий старт» - 4 минуты при 95°C; 31 цикл: денатурация при 94°C, отжиг 1 минута 45 сек. при 55°C, синтез - 1 минута при 72°C, достройка - 10 минут при 72°C.

Амплификацию гена GH проводили с использованием реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащую 1xTaq-буфер, 0,2 мМ dNTP's, 2 мМ MgCL2, 500-1000 пМ каждого праймера, 0,05 е. а./мкл Taq-полимеразы, 1 ед. геномной ДНК.

Продукты рестрикции GH1 разделяли в 2,5% агарозном геле при 90 В в течение 60 мин.

В результате проведенных исследований по генотипированию кур и петухов отечественной селекции (n=140) установлено, что частота встречаемости аллеля GH<sup>A</sup> в среднем у петухов составила 0,825, у кур – 0,706, частота аллеля GH<sup>B</sup> петухов составила – 0,175, кур – 0,294 в зависимости от группы и кросса. При этом в популяции выявлено нарушение генетического равновесия (P<0,01) в сторону преобладания особей с аллелем GH<sup>A</sup> что связано с проведением преимущественной селекции птицы на увеличение яичной продуктивности.

Частота встречаемости генотипа GH<sup>AA</sup>, положительно ассоциированного с яичной продуктивностью, распределилась в зависимости от группы птицы от 30 до 100%. Гетерозиготный генотип АВ варьировал в диапазоне от 10 до 100%. Частота встречаемости генотипа GH<sup>BB</sup> в диапазоне от 0 до 60%, лишь в одной группе птицы наблюдалось высокое содержание нежелательного аллеля и составило 60%.

Таким образом, в результате исследований, определен достаточно высокий уровень полиморфизма гена гормона роста (GH) у кур и петухов отечественной селекции, подтверждающий проведение преимущественной селекции птицы на увеличение яичной продуктивности.

#### Список использованных источников

1. Kansaku N., Hiyama G., Sasanami T., Zadworny D. Prolactin and growth hormone in birds: protein structure, gene structure and genetic variation // J. Poultry Sci. – 2008. – 45. – P. 1–6.
2. Enayati B., Rahimi-Mianji G. Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming growth factor  $\beta$ -3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls // Afr. J. Biotechnol. – 2009. – 8, <sup>1</sup> 14. – P. 3154–3159.
3. Feng X.P., Kuhnlein U., Aggrey S.E., Gavora J.S., Zadworny D. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a white Leghorn strain // Poultry Sci. – 1997. – 76. – P. 1770–1775.

**ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ  
(*FRAGARIA ANANASSA DUCH.*) СОРТА «ВИМА ЗАНТА»****А.Г. Чернецкая, Ю.В. Малиновская, Н.П. Стригельская***Международный государственный экологический институт имени А.Д.Сахарова  
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, chealval@gmail.com*

Земляника садовая (*Fragaria ananassa Duch.*) является одной из самых популярных ягодных культур, что объясняется полезными свойствами ягод, высокими вкусовыми качествами, быстрым началом плодоношения и отдачей урожая, высокой приспособляемостью к различным условиям выращивания.

С каждым годом растёт спрос, поэтому необходимо большое количество посадочного материала, в тоже время промышленное выращивание земляники садовой сопряжено с рядом трудностей в основном связанных с высоким уровнем подверженности грибным, вирусным и микоплазменным заболеваниям [1, 2]. В настоящее время одним из основных методов получения большого количества здорового генетически однородного материала является микроклональное размножение.

В основе микроклонального размножения растений лежит способность к восстановлению из отдельных органов, частей и даже отдельных клеток. Активно делящиеся клетки расположены в недифференцированной ткани апикальных меристем, меристем пазушных почек стебля и др. Образование тканей меристемы можно индуцировать в условиях *in vitro* [3].

В процессе клонального микроразмножения растений используется ряд регуляторов роста [4], которые могут быть как естественного, так и искусственного происхождения. Одним из широко применяемых регуляторов роста является 6-БАП (6-бензиламинопурин). Он проявляет высокую активность в поддержании роста растений и индуцировании органогенеза [2, 5].

**Материалы и методы.** Объект исследования – земляника садовая (*Fragaria ananassa Duch.*) сорта Вима Занта. Исследования проводили на базе лаборатории экологической биотехнологии МГЭИ им.А.Д.Сахарова БГУ.

Сорт Вима Занта является гибридом голландской селекции («Vissers Aardbeiplanten B.V.»), был выведен путем скрещивания линий «Эльсанта» и «Корона». Официально зарегистрирован в Государственных реестрах растений, допущенных к выращиванию на территории Беларуси (в 2002 г). «Вима Занта» относится к традиционным (неремонтантным) разновидностям среднераннего срока созревания, хорошо адаптирована к условиям умеренно-континентального климата, почвам природных зон смешанных лесов и лесостепи, отличается зимостойкостью, поэтому рекомендуется к возделыванию в открытом грунте. Сорт обладает высокой устойчивостью к таким распространенным заболеваниям как: вертициллезное увядание, фузариоз, серая гниль, а также слабо подвержен поражениям мучнистой росой и вредителями.

Исходным материалом служили молодые розетки земляники садовой. Для введения в культуру *in vitro* материал заготавливали в осенний период (конец сентября-конец октября). Хранение материала осуществлялось в сухих пластиковых пакетах при температуре 2°C, при этом с не укорененных розеток удаляли все листья (корни отсутствовали или были в зачаточном состоянии) (рисунок 1).



Рисунок 1. – Исходный материал земляники садовой сорта Вима Занта. Хранение биоматериала

Стерилизацию исходного материала проводили в два этапа:

1. Молодые розетки земляники садовой очищали от остатков земли и кроющих листьев и промывали с мылом в теплой проточной воде 10 минут, затем 60 минут в проточной воде и ополаскивали дистиллированной водой.

2. Далее работа проводилась в ламинарном боксе. Подготовленные экспланты помещали в 70% спирт на 5 минут, затем переносили в 50% перекись водорода на 10 минут, после этого исходный материал промывали стерильной дистиллированной водой 3 раза по 10 минут.

Для культивирования использовали агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга приготовленную с использованием набора реагентов ООО «БиолоТ» (Россия): 20-кратный раствор макроэлементов (кат.№ 1.3.003.), 1000-кратный раствор микроэлементов (кат.№ 1.3.004.), 1000-кратный раствор витаминов (кат.№ 1.3.005.), 100-кратный раствор хелата железа (кат.№ 1.3.006.), сахароза (кат.№ 1.3.007.), агар-агар (кат.№ 1.3.009.).

В качестве регулятора роста нами был использован 6-БАП (6- бензиламинопурин) ООО «БиолоТ» (Россия, кат.№ 1.3.032.) в концентрациях: 0,25мг/л, 0,5 мг/л, 0,75 мг/л, 1 мг/л.

На каждый вариант среды различной концентрации высаживали по 20 эксплантов. Показатели пролиферативной активности (коэффициент размножения и высота растений) оценивалась по 4 пассажам для каждой концентрации 6-БАП (рисунок 2).

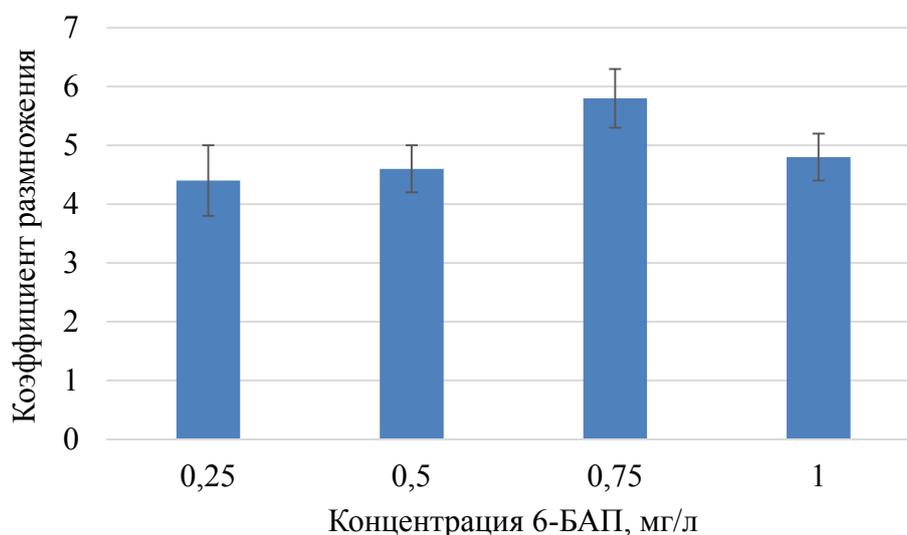


Рисунок 2. – Размножение земляники садовой сорта Вима Занта

#### Результаты и обсуждение.

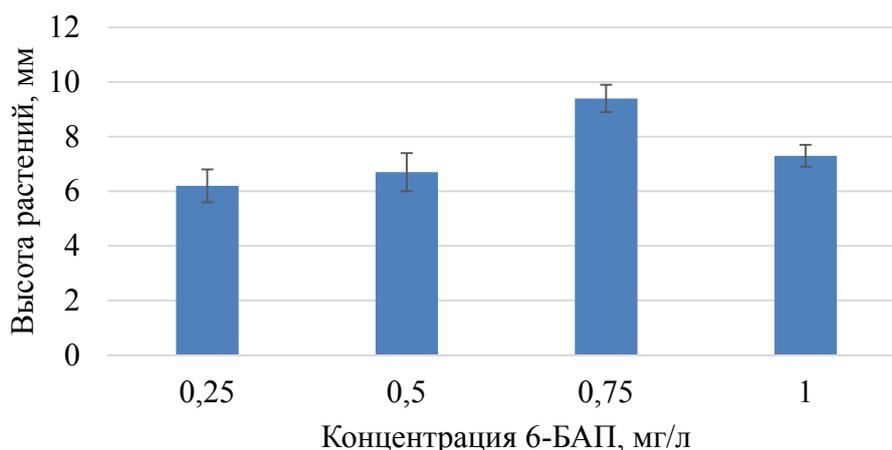
Целью настоящего исследования явилось определение оптимальной концентрации 6-БАП для размножения земляники садовой сорта «Вима Занта». Для этого нами были оценены такие показатели пролиферативной активности как коэффициент размножения растений и высота растений для четырех концентраций 6-БАП – 0,25мг/л, 0,5 мг/л, 0,75 мг/л, 1 мг/л.

Наибольшее значение коэффициента размножения нами было зарегистрировано для концентрации 0,75 мг/л –  $5,8 \pm 0,5$  (рисунок 3). На остальных трех концентрациях 0,25мг/л, 0,5 мг/л, 1 мг/л коэффициент размножения был ниже и составил  $4,4 \pm 0,6$ ;  $4,6 \pm 0,4$ ;  $4,8 \pm 0,4$  соответственно. Причем статистически достоверных различий между этими тремя концентрациями не обнаружено.



**Рисунок 3. – Зависимость коэффициента размножения земляники садовой сорта «Вима Занта» от концентрации 6-БАП.**

Растения с наибольшей высотой нами также наблюдались при концентрации 6-БАП равной 0,75 мг/л (рисунок 4). Для концентраций 0,25мг/л, 0,5 мг/л, 1 мг/л высота растений составила  $6,2\pm 0,6$ ;  $6,7\pm 0,7$ ;  $7,3\pm 0,4$  соответственно.



**Рисунок 4. – Зависимость высоты растений земляники садовой сорта «Вима Занта» от концентрации 6-БАП.**

Как видно из рисунка 4, самые низкие показатели высоты растений наблюдались для концентраций 0,25мг/л, 0,5 мг/л.

**Выводы.** На основании полученных нами результатов можно сделать вывод, что оптимальной концентрацией цитокинина 6-БАП при культивировании *in vitro* земляники садовой сорта «Вима Занта» является концентрация 0,75 мг/мл.

#### Список использованных источников

1. Мацнева, О.В. Оптимизация сроков введения земляники в культуру *in vitro* / О.В. Мацнева, Л.В. Ташматова // Электронный журнал Современное садоводство. 2018. №2. С. 78 – 83.
2. Мацнева, О.В. Пролиферативная активность сортов земляники садовой в культуре *in vitro* / О.В. Мацнева, Л.В. Ташматова, В.Е. Джафарова // Электронный журнал Современное садоводство. 2016. №1. С. 77 – 82.
3. Биотехнология в растениеводстве: учебник / Н.А. Картель, А.В. Кильчевский. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 310 с.

4. Palei S. In vitro studies of strawberry – an important fruit crop: a review / S. Palei, A.K. Das, G.R. Rout // The Journal of Plant Science Research. 2015. Vol. 31, N2. P. 115 – 131.

5. Джигadlo, Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / Е.Н. Джигadlo, М.И. Джигadlo, Л.В. Голышкина – Орел: ВНИИСПК, 2005. – 49 с.

# МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

## АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

УДК 612-083:371

### РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОВ 2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЕМ

Н.В. Амаэбери<sup>1</sup>, Г.Н. Семенкова<sup>1</sup>, А.Г. Лисовская<sup>2</sup>,  
Е.А. Мельникова<sup>1</sup>, О.И. Шадыро<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, n.amaegberi@gmail.com

<sup>2</sup>Университет Нотр-Дам, Нотр-Дам, Индиана, США

2-Гексадеценаль – ненасыщенный альдегид, образующийся в организме из сфингозин-1-фосфата (С1Ф) при действии фермента С1Ф-лиазы [1]. Этот альдегид проявляет биологическую активность в отношении клеток эмбриональной почки человека НЕК293Т, цервикальной карциномы HeLa, фибробластов мыши NIH3T3 и глиомы крысы С6 [2, 3], вызывая реорганизацию цитоскелета и индуцируя апоптоз.

Ранее нами и другими авторами был установлен неферментативный путь образования 2-ГД в результате свободнорадикальной деструкции ряда сфинголипидов в условиях оксидативного стресса, обусловленного действием  $\gamma$ -, УФ-излучения, а также хлорноватистой кислоты [4, 5]. НОС1 образуется в галогенирующем цикле миелопероксидазы (МПО), локализованной преимущественно в нейтрофилах [6]. Эти клетки мигрируют в очаги воспаления, которые формируются при травмах, инсульте, инфекционных, нейродегенеративных, онкологических и других заболеваниях, осуществляя киллинг чужеродного материала посредством генерации активных форм кислорода и хлора (АФКХ), в том числе НОС1 [7]. Нами показано, что действие НОС1, продуцируемой в галогенирующем цикле миелопероксидазы, на эритроциты человека, клетки глиомы крысы С6 и НЕК293 индуцирует свободнорадикальную деструкцию сфинголипидов с образованием 2-ГД [8, 9]. Следовательно, нейтрофилы, являясь источником хлорноватистой кислоты, могут быть мишенью для 2-ГД в условиях оксидативного стресса.

Цель работы: изучить влияние 2-ГД на функциональные свойства нейтрофилов крови здоровых людей.

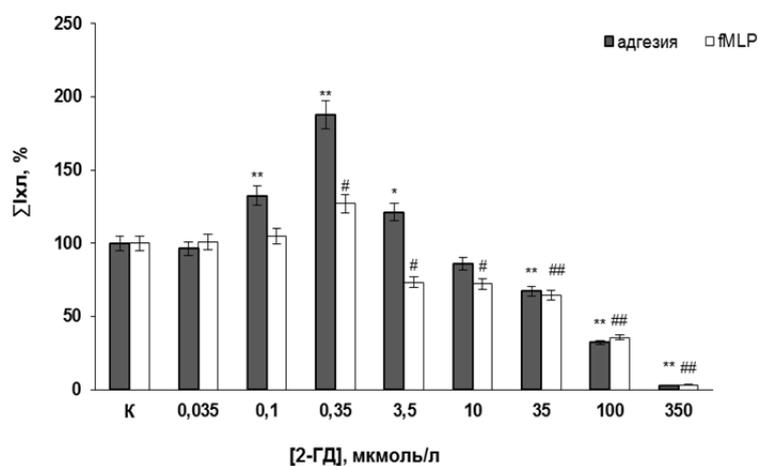
**Материалы.** В работе использовали декстран, гистопак-1077, питательную среду RPMI-1640, иодида пропидиум (PI), бычий сывороточный альбумин (БСА), люминол, fMLP, Triton X-100, JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид), FCCP (карбонилцианид р-трифторометоксифенилгидразон), EGTA (этиленгликоль-бис( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты), *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma», США), Fura-2AM, Alexa Fluor 532 Phalloidin («Thermo Fisher Scientific», США), набор для определения апоптоза Annexin V-FITC («Trevigen», США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х, Беларусь»). 2-ГД был синтезирован на кафедре органической химии химического факультета БГУ.

**Методы.** Нейтрофилы выделяли из крови здоровых людей по стандартной методике [10]. Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом с использованием иодида пропидиума (PI,  $\lambda_{\text{возб}} = 530$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 640$  нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) [11]. Генерацию АФКХ изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛюмХЛ) [12], на хемилюминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь). Продукцию АФКХ стимулировали добавлением 0,1 мкмоль/л хемотаксического пептида fMLP. Изменение митохондриального потенциала клеток ( $\Delta\Psi_m$ ) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ( $\lambda_{\text{ex}}=490$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=530$  нм, 590 нм) [13]. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм ( $I_{590}/I_{530}$ ) пропорционально  $\Delta\Psi_m$ . Концентрацию ионов несвязанного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM ( $\lambda_{\text{ex}}=340, 380$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=510$  нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь). Пробоподготовку и калибровку проводили согласно методике [14]. Концентрацию ионов несвязанного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках С6 и нейтрофилах рассчитывали по уравне-

нию Гринкевица. Состояние цитоскелета клеток при действии 2-ГД оценивали с помощью Alexa Fluor 532 Phalloidin [15]. Апоптоз клеток оценивали с помощью набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, согласно методике [16].

**Результаты и обсуждение.** С целью определения цитотоксичности 2-ГД нами изучено влияние этого альдегида на жизнеспособность нейтрофилов. Методом флуоресценции с использованием PI показано, что инкубирование клеток с 2-ГД в диапазоне концентраций 0,35-35 мкмоль/л в течение 30 мин не приводит к изменению их жизнеспособности. При увеличении концентрации исследуемого альдегида (100 и 350 мкмоль/л) через 30 мин наблюдается незначительное снижение жизнеспособности нейтрофилов до  $(92,9 \pm 2,7)$  % и  $(89,4 \pm 2,2)$  % соответственно.

На рисунке 1 показано влияние 2-ГД в широком диапазоне концентраций на суммарную интенсивность ЛюмХЛ стимулированных нейтрофилов. Видно, что инкубирование клеток в течение 30 мин с 2-ГД в диапазоне концентраций 0,1-3,5 мкмоль/л приводит к росту продукции АФКХ клетками при адгезии. Повышение концентрации 2-ГД до 10 и 35 мкмоль/л вызывает снижение генерации АФКХ на 14,9 % и 33,8 % соответственно. 2-ГД в концентрации 0,035 и 0,1 мкмоль/л не оказывает влияния на кислородактивирующую способность клеток при стимуляции fMLP. Инкубирование нейтрофилов с 2-ГД в концентрации 0,35 мкмоль/л приводит к увеличению интенсивности ЛюмХЛ на 27,2 %, а повышение концентрации исследуемого альдегида (3,5–35 мкмоль/л) вызывает снижение продукции АФКХ клетками на  $(27,2-36,7)$  % соответственно.

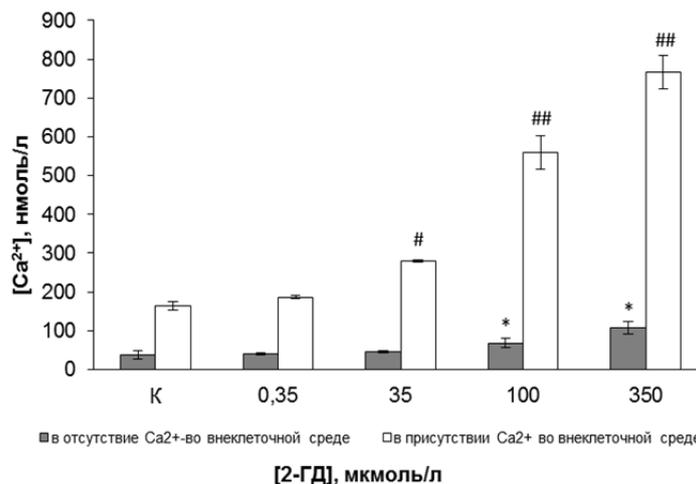


**Рисунок 1. – Влияние 2-гексадеценаля на ЛюмХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией (серые столбики) и хемотаксическим пептидом fMLP (светлые столбики)**

Формирование “респираторного взрыва” в нейтрофилах обусловлено модификацией многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации [17]. С целью выявления механизмов влияния 2-ГД на продукцию АФКХ клетками, нами изучено действие на этот процесс специфических ингибиторов ряда ферментов, участвующих в процессах трансдукции активационного сигнала в нейтрофилах при их стимуляции fMLP. С помощью специфических ингибиторов компонентов сигнальных путей установлено, что в повышение продукции АФКХ нейтрофилами при действии 0,35 мкмоль/л 2-ГД вносят вклад НАДФН-оксидаза, МПО, липоксигеназа (ЛО) и JNK-МАПК.

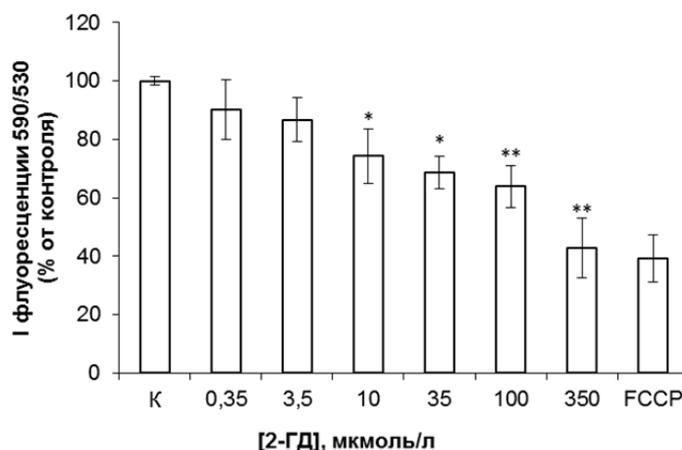
Генерация АФКХ в нейтрофилах сопряжена с повышением концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток. Увеличение уровня ионов кальция в цитоплазме нейтрофилов необходимо для их активации, продукции АФКХ, регуляции процессов гибели и клиренса этих клеток [18]. Увеличение концентрации несвязанных ионов кальция в этих клетках может наблюдаться также при запуске апоптоза. Нами изучено влияние 2-ГД в различных концентрациях на уровень цитозольного кальция в нейтрофилах в зависимости от его наличия во внеклеточной среде. Результаты представлены на рисунке 2. Видно, что при добавлении 2-ГД к клеткам наблюдается повышение уровня  $[Ca^{2+}]_i$  как в отсутствие, так и в присутствии ионов кальция во внеклеточной среде. Однако, если в отсутствие кальция вне клеток заметное повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в цитозоле по сравнению с контролем (в 1,8 раза) обнаруживается при концентрации 2-ГД 100 мкмоль/л, тогда как в присутствии внеклеточного кальция такой же прирост внутриклеточных ионов  $Ca^{2+}$  зарегистрирован для 35 мкмоль/л этого альдегида. При концентрации 2-ГД 100 и 350 мкмоль/л уровень цитозольного кальция повышается в 3,4 и 4,7 раза соответственно. Следует отметить, что при обработке клеток 0,35

мкмоль/л 2-ГД как в присутствии, так и в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  во внеклеточной среде, концентрация этих ионов в цитозоле не изменяется.



**Рисунок 2. – Влияние 2-ГД на концентрацию несвязанных ионов кальция в цитоплазме нейтрофилов**

Увеличение концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и одновременное уменьшение продукции АФКХ может быть связано с подавлением редокс-активности митохондрий, что в свою очередь может свидетельствовать о развитии апоптотического процесса [19]. На рисунке 3 показано влияние 2-ГД на величину митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов.



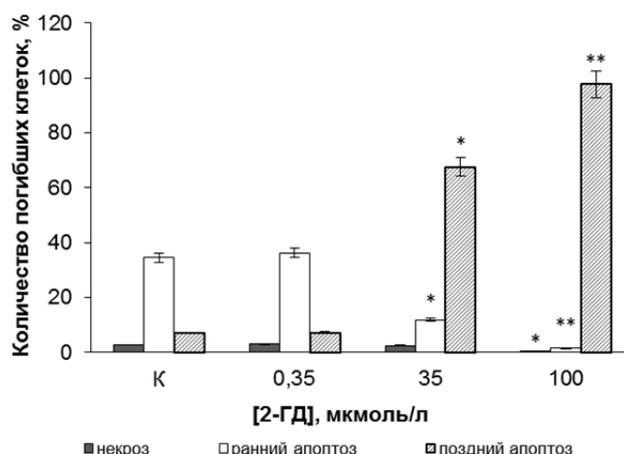
**Рисунок 3. – Влияние 2-гексадеценаля на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах**

Видно, что добавление 2-ГД (3,5–350 мкмоль/л) к суспензии клеток вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий на (25,7–57,3) %. При этом, действие 2-ГД в концентрации 350 мкмоль/л, сопоставимо с действием известного разобщителя FCCP, что, по-видимому, связано с цитотоксичностью этого альдегида в высоких концентрациях.

Изменение функциональной активности нейтрофилов сопровождается модификацией цитоскелета. Мы оценили влияние 2-ГД на состояние актинового цитоскелета при адгезии клеток к поверхности стекла. Установлено, что 2-ГД в концентрациях 35 и 0,35 мкмоль/л вызывает реорганизацию цитоскелета нейтрофилов, что выражается в изменении морфологических характеристик и перераспределении F-актина.

На рисунке 4 показано влияние 2-ГД на апоптоз нейтрофилов. Видно, что инкубирование клеток с 0,35 мкмоль/л 2-ГД в течение 4 ч не влияет на апоптотические процессы в этих клетках. В то же время, обработка клеток 35 мкмоль/л 2-ГД приводит к снижению количества живых клеток, а также клеток в стадии раннего апоптоза до 17,8 % и 11,9 % соответственно. В этом случае основная часть популяции нейтрофилов 67,7 % находится в стадии позднего апоптоза. С увеличением концентрации исследуемого альдегида до 100 мкмоль/л практически все клетки 97,7 % окрашива-

ются как Annexin V, так и PI, что свидетельствует о переходе клеток в стадию позднего апоптоза. Мы полагаем, что отсутствие клеток в стадии некроза, после инкубирования со 100 мкмоль/л 2-ГД связано, с потерей некоторого количества клеток в процессе пробоподготовки. Таким образом, 2-ГД в концентрациях 35 и 100 мкмоль/л усиливает стимулированный адгезией апоптоз нейтрофилов.



**Рисунок 4. – Количество погибших нейтрофилов при действии 2-гексадеценаля**

**Заключение.** Таким образом, 2-ГД дозозависимо регулирует функции нейтрофилов. В низких концентрациях этот альдегид оказывает праймирующее действие на клетки, что выражается в увеличении выхода АФКХ за счет повышения вкладов НАДФН-оксидазы, МПО, ЛО и JNK-МАПК. При более высоких концентрациях 2-ГД индуцирует апоптоз, что коррелирует со значительным увеличением несвязанных ионов кальция в цитоплазме, уменьшением продукции АФКХ и снижением митохондриального мембранного потенциала. Оба эти процесса сопряжены с реорганизацией цитоскелета.

*Работа выполнена при поддержке Всемирной организации учёных (World Federation of Scientists).*

#### Список использованных источников

- Gault, C.R. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown / C.R. Gault, L.M. Obeid, Y.A. Hannun // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 688. – P. 1–23.
- Kumar, A. The sphingolipid degradation product *trans*-2-hexadecenal induces cytoskeletal reorganization and apoptosis in a JNK dependent manner / A. Kumar [et. al] // *Cell Signal.* – 2011. – Vol. 23. – P. 1144–1152.
- Amaegberi, N.V. 2-Hexadecenal inhibits growth of C6 glioma cells /N.V. Amaegberi, G.N. Semenkova, Z.B. Kvacheva, A.G. Lisovskaya, S.V. Pinchuk, O.I. Shadyro // *Cell. Biochem. Funct.* – 2019. – Vol. 37. – P. 281-289.
- Lisovskaya, A.G. A new mechanism for photo- and radiation-induced decomposition of sphingolipids / A.G. Lisovskaya, O.I. Shadyro, I.P. Edimecheva // *Lipids.* – 2011. – Vol. 46. – P. 271–276.
- Brahmbhatt, V.V. Novel carbonyl and nitrile products from reactive chlorinating species attack of lysosphingolipid / V.V. Brahmbhatt [et. Al] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2007. – Vol. 145. – P. 72–84.
- Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function /Y. Aratani // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2018. – Vol. 640. – P. 47–52.
- Kolaczowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczowska, P. Kubes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 159–175.
- Shadyro, O. Free-radical destruction of sphingolipids resulting in 2-hexadecenal formation / O. Shadyro, A. Lisovskaya, G. Semenkova, I. Edimecheva, N. Amaegberi // *Lipid insights.* – 2015. – Vol. 8. – P. 1–9.
- A. Lisovskaya, K. Pratsenka, A. Kulinkina, G.N. Semenkova, O. Shadyro, Sphingolipid destruction in HOCl-treated red blood cells, *FEBS J.* – 2015. – Vol. 282. – P. 235.
- Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.

11. Kato, F. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents / F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura // *Toxicol. In Vitro.* – 1999. – Vol. 13. – P. 923–929.
12. Liu, L. A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils / L. Liu [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 1996. – Vol. 192, № 1–2. – P. 173–178.
13. Sivandzade, F. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // *Bio Protoc.* – 2019. – Vol. 9 (1).
14. Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in whole cell suspensions using Fura-2 // *Methods in molecular biology. Calcium signaling protocols* / A. Patel [et al.] ; ed. D.G. Lambert. – Totowa, 2013. – P.37–45.
15. Cui, X. F-actin cytoskeleton reorganization is associated with hepatic stellate cell activation / X. Cui [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1641–1647.
16. Measurement of apoptosis in cell culture // *Methods in biotechnology, animal cell biotechnology: methods and protocols*, 2nd ed. / A. Ishaque, M. Al-Rubeai ; ed. R. Pörtner. – Totowa, 2007. – P. 285–299.
17. Zhang, J. ROS and ROS-mediated cellular signaling / J. Zhang [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016.
18. Ribeiro, D. Calcium pathways in human neutrophils – the extended effects of thapsigargin and ML-9 / D. Ribeiro [et al.] // *Cells.* – 2018. – Vol. 7 (11).
19. McCracken, J.M. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease / J.M. McCracken, L-A.H. Allen // *J. Cell Death.* – 2014. – Vol. 7. – P. 15–23.

УДК 611.612.08

## 2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЬ МОДИФИЦИРУЕТ ФУНКЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

**А.В. Богданова<sup>1</sup>, Н.В. Амаэбери<sup>1</sup>, Г.Н. Семенкова<sup>1</sup>, А.Г. Полешко<sup>2</sup>,  
З.Б. Квачева<sup>2</sup>, О.И. Шадыро<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН РБ, Минск, Беларусь  
bognasty23@mail.ru*

**Введение.** 2-Гексадеценаль (2-ГД) – ненасыщенный жирный альдегид. В организме человека это соединение образуется при необратимом ферментативном расщеплении сфингозин-1-фосфата – сфинголипида, регулирующего процессы пролиферации и апоптоза клеток [1]. Ранее нами установлено, что 2-ГД может образовываться из ряда сфинголипидов неферментативным путем в условиях оксидативного стресса, обусловленного действием  $\gamma$ -, УФ-излучения и НОС1 в результате свободнорадикальной фрагментации [2].

Известно, что клетки кожи богаты различными сфинголипидами, такими как церамиды, сфингозин и сфингозин-1-фосфат [3]. Мы предположили, что накопление 2-ГД в результате свободнорадикальной фрагментации сфинголипидов под действием факторов окружающей среды в дермальных фибробластах, которые являются основными компонентами кожи, будет влиять на их функционирование.

В настоящей работе изучено влияние 2-ГД на функции дермальных фибробластов *in vitro*, а именно: на генерацию клетками пероксида водорода, изменение уровня восстановленного глутатиона и митохондриального мембранного потенциала, а также на иницирование апоптотических процессов.

**Материалы и методы.** Фибробласты выделяли методом миграции из эксплантов кожи здоровых доноров в условиях лаборатории и выращивали *in vitro* в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% сыворотки в условиях 100 % влажности и 5 % содержания  $CO_2$  при температуре 37<sup>0</sup>С. В экспериментах использовали культуры 2-3 пассажей в логарифмической фазе роста.

Уровень восстановленного глутатиона (GSH) в клетках определяли с помощью флуоресцентного зонда монохлоробимана (MCB,  $\lambda_{ex}$  = 390 нм,  $\lambda_{em}$  = 480 нм). Результаты представлены как отношение уровня GSH в клетках в присутствии 2-ГД к уровню GSH в контрольном образце. Способность клеток генерировать  $H_2O_2$  оценивали с использованием флуоресцентного зонда  $H_2DCFDA$  (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат). Величину митохондриального мембранного потенциала определяли с использованием флуоресцентного зонда JC-1 ( $\lambda_{ex}$ =490 нм,  $\lambda_{em}$ =530, 590 нм). В качестве положительного контроля к суспензии клеток добавляли разобщитель дыхательной цепи

– карбонилцианид 4-(трифлуорометокси)фенилгидразона (FCCP). Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм ( $I_{590}/I_{530}$ ) пропорционально величине митохондриального мембранного потенциала. Интенсивность флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре CM2203 «Solar» (Беларусь). Апоптоз клеток оценивали с помощью набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, согласно методике [4]. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

**Результаты и обсуждение.** Поддержание в клетке постоянного соотношения GSH к окисленному (GSSG) – GSH/GSSG является необходимым для обеспечения ее нормальной жизнедеятельности. GSH является чувствительным маркером оксидативного стресса. Снижение уровня GSH может свидетельствовать об изменении редокс-состояния данных клеток, в частности усиление генерации активных форм кислорода, и является сигналом к индуцированию апоптоза путем активации рецепторов смерти либо запуска митохондриального апоптотического пути [5].

На рис. 1 показано влияние 2-ГД в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкмоль/л на уровень GSH в фибробластах. Видно, что в концентрации 10 мкмоль/л этот альдегид не оказывает влияния на уровень GSH в клетках. Инкубирование фибробластов с 2-ГД в концентрациях 25, 50 и 100 мкмоль/л приводит к дозозависимому снижению регистрируемого параметра.

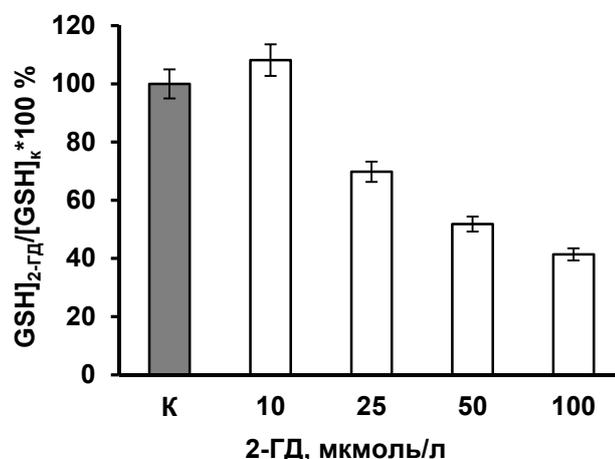


Рисунок 1. – Влияние 2-гексадеценаля на уровень восстановленного глутатиона в культуре фибробластов

Снижение уровня GSH под действием 2-ГД может быть связано с усилением образования активных форм кислорода в этих клетках в результате активации НАДФН-оксидазного комплекса и / или с нарушением функционирования митохондрий. И то, и другое приводит к увеличению продукции супероксидных анион-радикалов, которые легко трансформируются в пероксид водорода. На рисунке 2 представлено влияние 2-ГД на образование  $H_2O_2$  фибробластами. Видно, что с ростом концентрации альдегида происходит увеличение генерации  $H_2O_2$ . Добавление 2-ГД в концентрации 10, 50 и 100 мкмоль/л приводит к увеличению продукции  $H_2O_2$  клетками на 11,87 %, 14,16 % и 22,25 % соответственно.

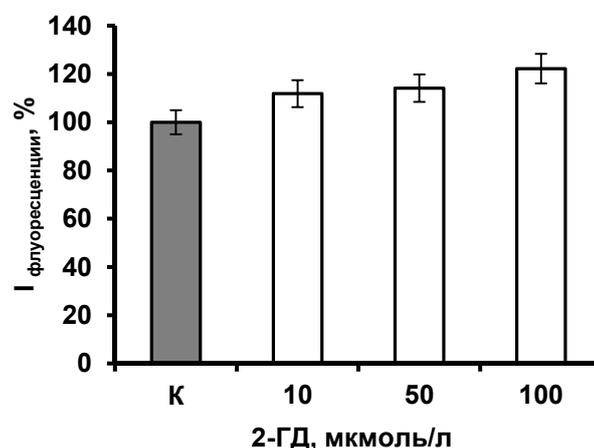
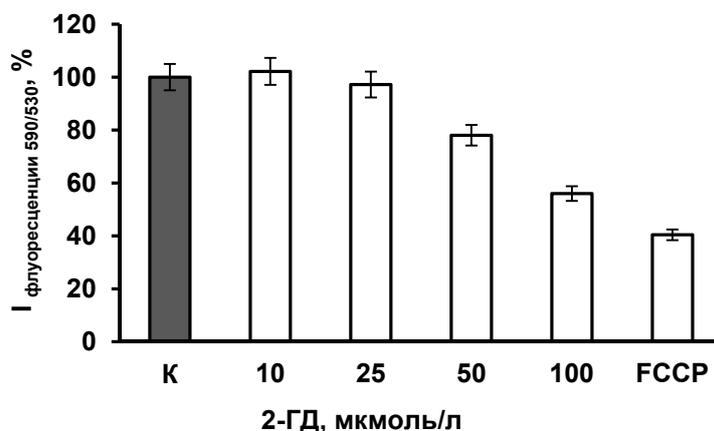


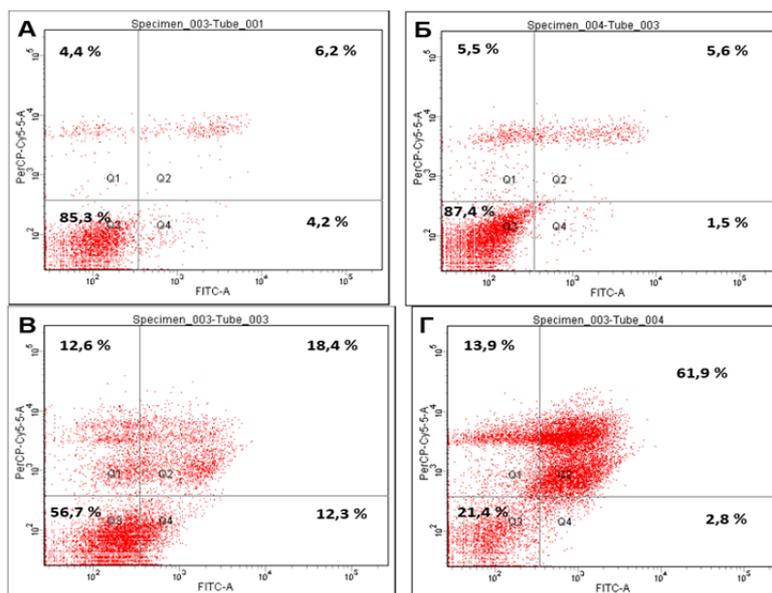
Рисунок 2. – Влияние 2-гексадеценаля на продукцию  $H_2O_2$  фибробластами

Из рис. 3 видно, что 2-ГД в концентрациях 10 и 25 мкмоль/л не влияет на митохондриальный мембранный потенциал. Добавление этого альдегида в концентрациях 50 и 100 мкмоль/л приводит к значительному снижению величины мембранного потенциала митохондрий.



**Рисунок 3. – Влияние 2-гексадецаня на митохондриальный мембранный потенциал фибробластов**

Одной из причин снижения митохондриального мембранного потенциала может являться индуцирование апоптоза в дермальных фибробластах под действием 2-ГД. На рис. 4 в виде точечных диаграмм представлены результаты влияния 2-ГД на апоптоз фибробластов клеток, инкубированных в течение 4 ч с контрольным раствором (А), с 10 мкмоль/л (Б), 50 мкмоль/л (В) и 100 мкмоль/л (Г) 2-ГД, после окрашивания Annexin V-FITC и PI. На участках Q1, Q2, Q3 и Q4 представлено количество некротических клеток, клеток в стадии позднего апоптоза, живых клеток и клеток в стадии раннего апоптоза соответственно.



**Рисунок 4. – Влияние 2-гексадецаня на апоптоз фибробластов**

Из рис. 5 видно, что инкубирование клеток с 10 мкмоль/л 2-ГД в течение 4 ч не влияет на апоптотические процессы в этих клетках. В то же время, обработка клеток 50 и 100 мкмоль/л этого альдегида приводит к снижению количества живых клеток. При этом возрастает число клеток в стадиях раннего и позднего апоптоза.

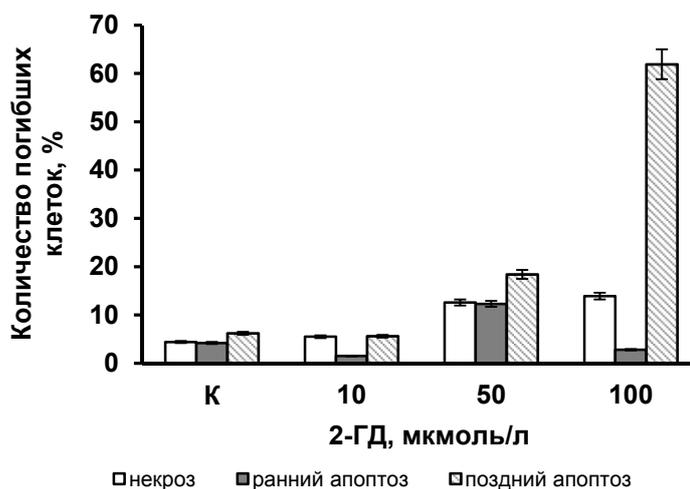


Рисунок 5. – Количество апоптотических фибробластов при действии 2-гексадеценаля

**Заключение.** Таким образом, из полученных данных следует, что при действии 2-ГД наблюдается дозозависимое изменение редокс-активности дермальных фибробластов. Это выражается в уменьшении уровня восстановленного глутатиона в цитоплазме клеток, увеличении продукции пероксида водорода и уменьшении митохондриального мембранного потенциала. Изменение редокс-состояния фибробластов под действием 2-ГД сопровождается индуцированием апоптоза.

#### Список использованных источников

1. Hannun, Y.A. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease / Y.A. Hannun, L.M. Obeid // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 19(3). – P. 175–191.
2. Shadyro, O. Free-radical destruction of sphingolipids resulting in 2-hexadecenal formation / O. Shadyro, A. Lisovskaya, G. Semenkova, I. Edimecheva, N. Amaegberi // *Lipid insights.* – 2015. – Vol. 8. – P. 1–9.
3. Driskel, R. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin / R. Driskel, F. Watt // *Trends in Cell Biology.* – 2015. – Vol. 25 (2). – P. 92-99.
4. Measurement of apoptosis in cell culture // *Methods in biotechnology, animal cell biotechnology: methods and protocols*, 2nd ed. / A. Ishaque, M. Al-Rubeai; ed. R. Pörtner. – Totowa, 2007. – P. 285–299.
5. Circu, M.L. Glutathione and modulation of cell apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1823. – P. 1767–1777.

УДК 661.833

### АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ НАТРИЯ ХЛОРИДА И pH РАСТВОРА ИЗОТОНИЧЕСКОГО ДЛЯ ИНФУЗИЙ 9 МГ/МЛ

Е.М. Волкова, А.А. Горбач

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

Натрия хлорид содержится в плазме крови (около 0,5 %) и тканевых жидкостях организма. Он является основным неорганическим компонентом, поддерживающим осмотическое давление плазмы крови и внеклеточной жидкости.

Инфузионная терапия является неотъемлемой частью лечения любого заболевания или критического состояния, сопровождающегося расстройствами водно-электролитного баланса. Кроме того, внутривенное введение различных растворов широко используется во всех областях медицины [5].

**Материалы и методы исследований.** Испытания лекарственного препарата на промежуточную продукцию проводят согласно спецификации на промежуточную продукцию СП-1100-2-038 [3], где описано, согласно каким методикам проводят испытания или ссылки на методики испытаний, а также указано количество пробы на 1 испытание в миллилитрах.

В растворе промежуточной продукции проверяются показатели, которые должны соответствовать требованиям документов по контролю качества.

Испытания лекарственного препарата на готовую продукцию проводят согласно спецификации на готовую продукцию СП-1100-2-011 [4], где описано, согласно каким методикам проводят испытания или ссылки на методики испытаний.

При процессе производства лекарственного препарата количественное определение проверяется титриметрическим методом. Методика испытания валидирована.

Титриметрический метод определения содержания натрия хлорида раствором серебра нитрата в лекарственном препарате является современным и распространенным методом определения содержания данного компонента в исследуемом веществе. Реакции, основанные на образовании труднорастворимых солей серебра, широко применяются для определения различных анионов [1].

Оценку физико-химических показателей осуществляли по результатам контроля трех промышленных серий лекарственного препарата Натрия хлорид, раствор изотонический для инфузий 9 мг/мл в бутылках стеклянных 400 мл, производимых на ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов», серии:

741219 (7 224 бутылок);

751219 (7 128 бутылок);

020220 (6 996 бутылок).

Промышленные серии были произведены согласно ТИ-0527-2-001, где стандартная промышленная серия составляет: 6 750 – 7 234 бутылок.

**Обсуждение результатов.** На основании полученных данных была выполнена оценка качества в соответствии с требованиями ФСП РБ 0226 (действующая редакция), Государственной фармакопеи Республики Беларусь II в 2 томах [2].

На основании показателей трех промышленных серий были построены графики анализа контролируемых показателей (рисунок 1 – 4), по которым можно сделать заключение, что процесс находится в состоянии статистической управляемости.



Рисунок 1. – Анализ pH в промежуточной продукции (до стерилизации)



Рисунок 2. – Анализ количественного содержания натрия хлорида в промежуточной продукции (до стерилизации)

Анализируя показатели качества трех промышленных серий, можно сделать вывод, что процесс производства лекарственного препарата Натрия хлорид, раствор изотонический для инфузий 9 мг/мл в бутылках стеклянных, многократно проводимый в пределах установленных параметров, осуществляется эффективно с воспроизводимыми результатами и постоянно приводит к получению продукции, соответствующей установленным требованиям и характеристикам качества.

На момент проведения валидации процесса производства, оборудование имело статус «квалифицировано».

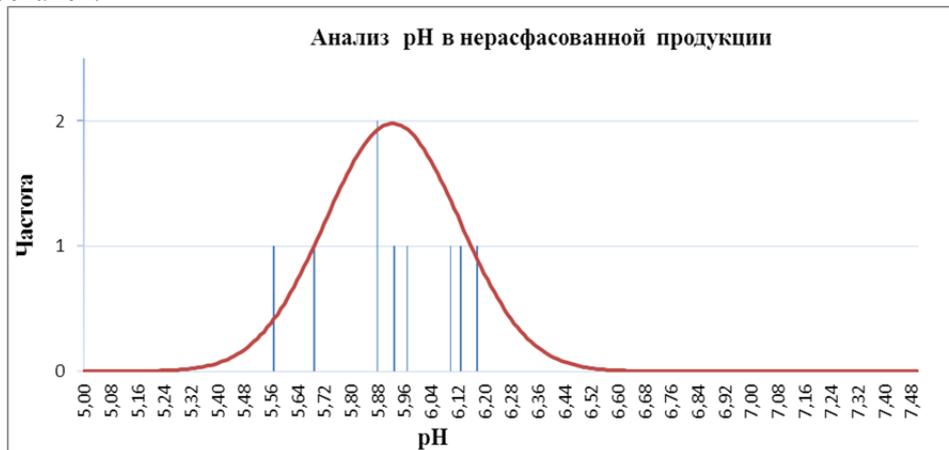


Рисунок 3. – Анализ рН в нерасфасованной продукции (после стерилизации)



Рисунок 4. – Анализ количественного содержания натрия хлорида в нерасфасованной продукции (после стерилизации)

Выпущенные серии продукции соответствовали требованиям нормативной документации и спецификации на продукт. Отклоненные серии на стадии промежуточного/готового продукта отсутствовали.

**Выводы:**

По результатам исследований рассчитаны основные метрологические характеристики методики количественного определения хлоридов в лекарственном препарате Натрия хлорид, раствор изотонический для инфузий 9 мг/мл титриметрическим методом. При осуществлении валидации было определено количественное содержание натрия хлорида в 3 промышленных сериях в соответствии с Государственной фармакопеей Республики Беларусь II.

Установлено, что все критические технологические параметры в процессе производства лекарственного препарата удовлетворяют установленным критериям приемлемости.

### Список использованных источников

1. ВО-1100-2-183 Отчет о валидации. Валидация методики испытаний количественного определения натрия хлорида в лекарственном средстве «Натрия хлорид, раствор для инфузий 9 мг/мл» в бутылках стеклянных, в полиэтиленовых бутылках «Bottlepack» и в контейнерах из ПВХ титриметрическим методом/ ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов»/ под ред. О.М. Якубелович – Несвиж: ОАО «НЗМП», 2018. – 4 с.
2. ВО-1812-2-008 Отчет. Валидация процесса производства лекарственного средства Натрия хлорид, раствор изотонический для инфузий 9 мг/мл в бутылках стеклянных 400 мл/ ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов»/ под ред. В.Ю. Макарецца – Несвиж: ОАО «НЗМП», 2020. – 128 с.
3. СП-1100-2-038 Спецификация на промежуточную продукцию Натрия хлорид, раствор изотонический для инфузий 9 мг/мл в бутылках стеклянных/ ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов» / под ред. В.Н. Кезик – Несвиж: ОАО «НЗМП», 2020. – 2 с.
4. СП-1100-2-011 Спецификация на готовую продукцию Натрия хлорид, раствор изотонический для инфузий 9 мг/мл в бутылках стеклянных 100 мл в упаковке № 1, № 20, № 35, № 40, 200 мл в упаковке № 1, № 20, № 24, № 40 и 400 мл в упаковке № 1, № 12, № 24/ ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов» / под ред. М.В. Шастун – Несвиж: ОАО «НЗМП», 2016. – 3 с.
5. Справочник лекарственных препаратов Видаль [Электронный ресурс] – Режим доступа – [http://mega.km.ru/health/Encyclop.asp?Topic=STAT\\_VIDAL3\\_3284](http://mega.km.ru/health/Encyclop.asp?Topic=STAT_VIDAL3_3284) – Дата доступа: 22.06.2021.

УДК 611.612.06

### АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СПЕРМОПЛАЗМЫ ПРИ ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МУЖСКОЙ ИНФЕРТИЛЬНОСТИ

Д.О. Герловский, Н.М. Литвинко

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск*

**Актуальность.** Мужское бесплодие является распространённой проблемой во всем мире. Для результативного лечения необходимо как можно раньше выявить заболевание репродуктивной системы и установить его этиологию. Для проведения ранней диагностики необходим поиск соответствующих молекул-маркеров, присутствие которых свидетельствовало бы о начале патологического процесса [1]. В качестве таких маркеров была изучена общая активность протеаз и фосфолипаз семенной жидкости в сопоставлении с общим количеством белка спермоплазмы. Как было нами ранее показано сопоставление уровня активности ФЛА<sub>2</sub> в семенной жидкости пациентов с диагнозом бесплодие и людей с нормальной репродуктивной функцией экспресс-методом геледиффузии даёт возможность прогнозной оценки потенциальной мужской инфертильности [2]. Тем не менее, использованный метод геледиффузии является полуколичественным, работает при сравнении опытного и контрольного образцов, и не даёт однозначного ответа на вопрос о конкретных значениях скоростей реакций гидролиза и активности ферментов [3].

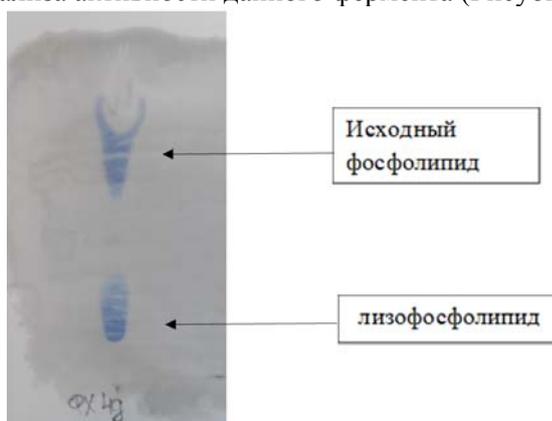
**Целью** настоящей работы являлось изучение общей протеазной и ФЛА<sub>2</sub> активности в сопоставлении с общим количеством белка спермоплазмы у здорового донора и больного бесплодием. А также изучение субстратной специфичности ФЛА<sub>2</sub> спермоплазмы при количественном анализе.

**Материалы и методы.** В работе были использованы классические методы определения протеазной активности и общего количества белка с применением реактива Фолина. В случае изучения общей протеазной активности исследовали реакцию гидролиза белка под действием спермоплазмы течения 30 минут с использованием БСА (козеина) в качестве субстрата реакции. В качестве продукта реакции регистрировали количество образовавшегося тирозина. В случае изучения общей ФЛА<sub>2</sub> активности исследовали реакцию гидролиза фосфолипидов под действием спермоплазмы в течении 60 минут (для расчёта активности) и нескольких суток (для определения специфичности к субстрату) с использованием фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в качестве субстрата реакции в составе смешанных мицелл фосфолипид:ТХ100 (1:3). В качестве продуктов реакции регистрировали количество образовавшегося лизолипида и исходного субстрата, разделённых методом ТСХ (Рисунок 1), с последующим анализом соответствующих пятен на количественное содержание фосфора методом Васьковского [4].

**Результаты и выводы.** Изучение общей протеазной активности при гидролизе белка под действием спермоплазмы течения 30 минут с использованием БСА (козеина) в качестве субстрата

реакции в вышеописанных условиях эксперимента показало значение скоростей реакции гидролиза на уровне 0,12 мкмоль/мл\*мин для больного с диагнозом бесплодие и 0,062 мкмоль/мл\*мин – для здорового донора, из чего можно сделать вывод об увеличении активности в два раза. Концентрация белка в условиях эксперимента *in vitro* для больного с диагнозом бесплодие и для здорового донора не отличалась и составила 0,88 мг/мл, что в пересчёте на исходный образец спермоплазмы составляло 8,8 мг/мл. Определённое значение концентрации белка несколько ниже литературных данных (70 мг/мл), что может объясняться временем хранения исследованных образцов, содержащих протеазную активность. Конечная общая протеазная активность спермоплазмы в пересчёте на мг белка составила 0,136 МЕ/мг в случае больного и 0,07 МЕ/мг в случае здорового доноров, что свидетельствует об увеличении активности ферментов при развитии заболевания.

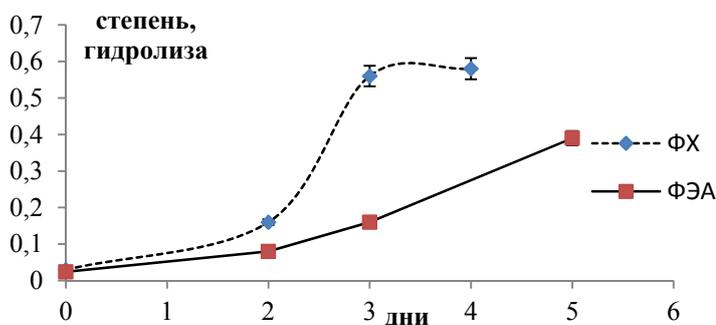
Изучение общей ФЛА<sub>2</sub> активности при гидролизе фосфолипидов под действием спермоплазмы с использованием фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в качестве субстрата реакции в составе смешанных мицелл фосфолипид:ТХ100 (1:3), показало наличие пятен гидролизованного субстрата, что может свидетельствовать о достаточной чувствительности метода с использованием ТСХ для анализа активности данного фермента (Рисунок 1).



**Рисунок 1. – Наличие пятна гидролизованного субстрата (ФХ, ФЭА) после инкубации со спермоплазмой.**

Значение скоростей реакции гидролиза под действие ФЛА<sub>2</sub> спермоплазмы в течении 60 минут в условиях эксперимента составило 0,0026 мкмоль/мин\*мл для здорового донора и 0,0195 мкмоль/мин\*мл – для больного, что с учётом количественного содержания белка спермоплазмы составляет 0,003 МЕ/мг для здорового донора и 0,022 МЕ/мг – для больного. Полученные данные свидетельствуют об увеличении активности ФЛА<sub>2</sub> при развитии патологии. Сравнение степени увеличения активности двух гидролаз говорит о большей чувствительности ФЛА<sub>2</sub> при использовании в качестве маркера заболевания.

Подбор субстрата для изучения общей активности ФЛА<sub>2</sub> в реакции гидролиза фосфолипидов под действием спермоплазмы в течении нескольких суток показал предпочтительное использование фосфатидилхолина (ФХ) в качестве субстрата реакции в сравнении с фосфатидилэтаноламином (ФЭА) в составе смешанных мицелл фосфолипид:ТХ100 (1:3) (рисунок 2).



**Рисунок 2. – Зависимость степени гидролиза фосфолипидов, выраженной в долях единицы, от времени реакции под действием ФЛА<sub>2</sub> спермоплазмы при использовании ФХ и ФЭА.**

**Заключение.** Таким образом, в дополнении к ранее изученному методу гель-диффузии, полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности изученных гидролаз при развитии патологического процесса, а также возможности использования метода ТСХ для количественного анализа активности ФЛА<sub>2</sub> спермоплазмы, с предпочтительным использованием фосфатидилхолина (ФХ) в качестве субстрата реакции.

#### Список использованных источников

1. Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / В. С. Камышников [и др.]; под общ. ред. В.С. Камышникова. М.:МЕВ пресс-информ., 2015. – 720 с.
2. Папино Д.С., Литвинко Н.М., Герловский Д.О. Использование метода определения лецитиназной активности при диффузии фермента в желточно-солевой агар для диагностики заболеваний репродуктивной системы/Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнологии микроорганизмов», г. Минск, 27-29 ноября 2019 г., С.379 – 381.
3. Литвинко Н. М. Набор реагентов «ФЛА<sub>2</sub>-ФОА» для определения активности панкреатической фосфолипазы А<sub>2</sub> в крови человека методом фотометрического анализа / Литвинко Н. М., Камышников В. С., Воробей А. В., Вижинис Ю. И., Юрага Т. М., Скоростецкая Л. А. //Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016, С. 121.
4. Vaskovsky, V.E. A universal reagent for phospholipid analysis / V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, J.M. Vasendin // J. of Chromatography. – 1975. – Vol. 114, № 1. – P. 129 –141.

УДК 611.612.08

### ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТА НА ОСНОВЕ ПИРОЛИТИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА С НАНОРАЗМЕРНЫМ РЕЛЬЕФОМ НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕЙРОННОЙ СЕТИ

А.А. Денисов<sup>1,3</sup>, О.Г. Поддубская<sup>2</sup>, Н.И. Волынец<sup>2</sup>, Т.А. Кулагова<sup>2</sup>, П.П. Кужир<sup>2</sup>,  
Ю.П. Токальчик<sup>3</sup>, С.Г. Пашкевич<sup>3</sup>, С.В. Губкин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск

<sup>2</sup>НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск

<sup>3</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

При проведении научных исследований в области биомедицины часто возникают задачи, связанные с анализом взаимодействия клеток и тканей с различными материалами. В частности, при исследовании механизмов функционирования клеток распространенной является методика культивирования *in vitro*, позволяющая исследовать клеточные процессы в контролируемых условиях. При этом, наряду с традиционными подходами по культивированию клеток в чашках Петри в настоящее время используются и устройства класса «лаборатория-на-чипе», позволяющие проводить мониторинг с помощью встроенных датчиков. Кроме того, в различных областях медицины разработка многих современных высокотехнологичных методов сопровождается применением имплантов различного типа. Поверхность импланта не должна вызывать отторжения и оказывать отрицательного влияния на организм. В этой связи актуальной становится задача поиска новых биосовместимых материалов, которые пригодны для изготовления такого рода устройств.

Особые требования предъявляются к материалам, контактирующим с нервными клетками. Поскольку нейроны являются электрически активными, основным методом изучения их функционирования является регистрация и стимуляция их электрической активности с использованием микроэлектродных сенсоров, которые непосредственно взаимодействуют с клетками и могут быть имплантированы в структуру центральной нервной системы. Сочетание методов биоинженерии нейронных сетей и устройств класса «лаборатория-на-чипе» открывает возможности для воссоздания и регистрации ряда функциональных процессов в нейронных сетях *in vitro*, в более простых и контролируемых условиях, нежели *in vivo*. Данный подход позволяет проводить эффективный фармакологический скрининг при моделировании различных форм нейродегенеративных заболеваний, таких как ишемия, травма, инсульт, эпилепсия, болезнь Альцгеймера и т. д. [1, 2], что, в свою очередь, подчеркивает актуальность исследований, направленных на разработку новых методов инженерии нейронных сетей и реализацию интерфейса с клетками нервной ткани.

Интеграция клеток с сенсорными субстратами предъявляет жесткие требования к качеству и физико-химическим свойствам материалов, из которых они изготавливаются [3, 4]. В частности,

для реализации интерфейса с нейронами материал должен быть биосовместимым, долговечным, неиммуногенным, электропроводящим, обладать нано- и микроструктурированной поверхностью, которую можно химически функционализировать; его нужно наносить на разные типы подложек и включать в структуру скаффолдов. В этой связи, уникальные физические свойства и высокая биосовместимость углеродных наноматериалов, к которым можно отнести наноалмазы, луковичные структуры углерода, углеродные нанотрубки, графен, фуллерены и т.д., позволяет рассматривать такие структуры и композиты на их основе в качестве перспективных материалов, подходящих для разработки компонентов интерфейса не только с нейронами, но и другими электрически активными клетками [5]. Так, высокая мобильность носителей заряда, большая удельная площадь поверхности, механическая гибкость, оптическая прозрачность и химическая инертность делают графен чрезвычайно привлекательным для нейроинженерии, и, в частности, для создания инвазивных имплантов, биосенсоров и микроэлектродов [5]. При этом, на поверхность графена можно эффективно иммобилизовать ДНК, ферменты, антитела, лиганды к рецепторам [6]. Однако, несмотря на большое количество работ, понимание взаимодействия графена с тканями мозга все еще ограничено, особенно в том, что касается воздействия структуры атомов углерода на потоки ионов в непосредственной близости от нейрональной мембраны в биологической среде.

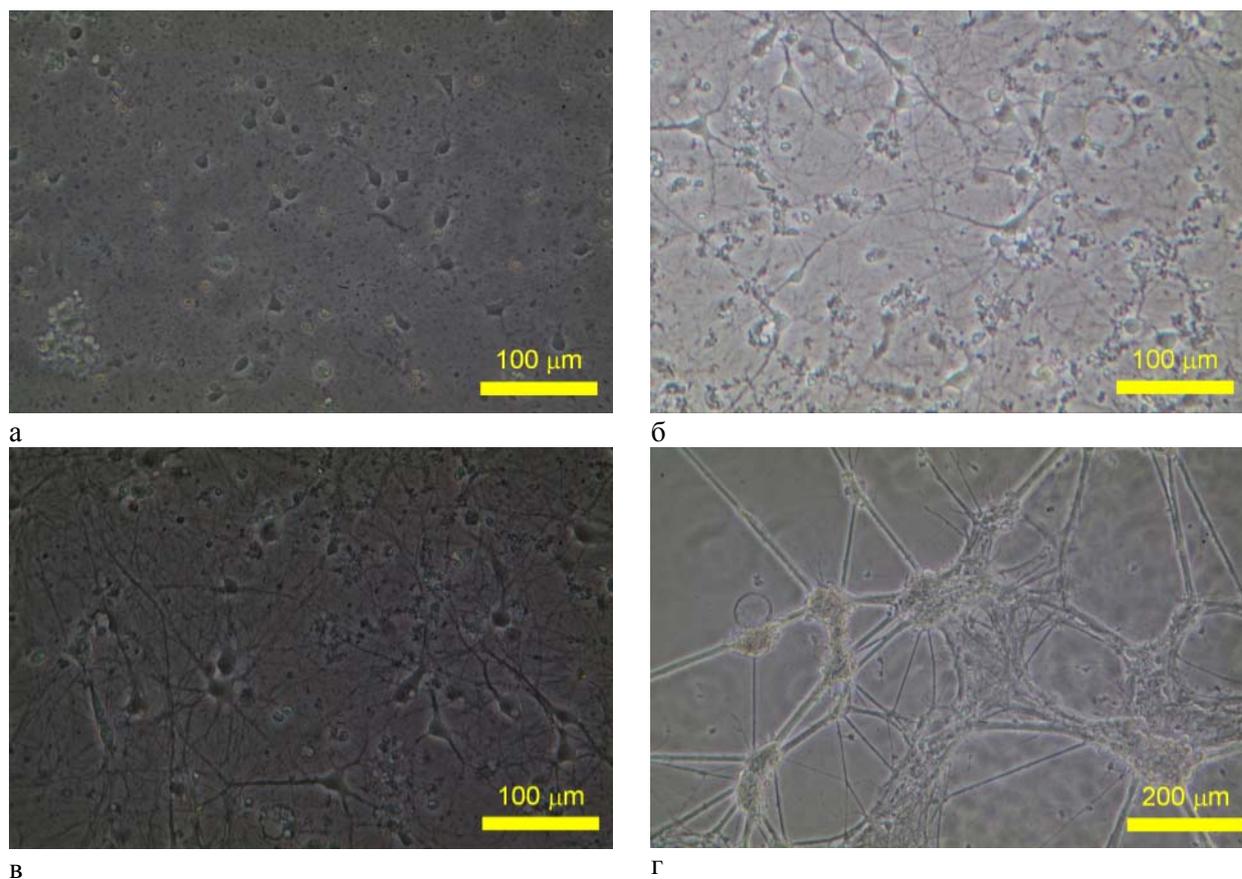
Вместе с тем, с практической точки зрения работа с графеном может быть методически сложной, что прежде всего связано с необходимостью применения специальных подложек для синтеза такого материала (так «классический» CVD синтез проводится на медных или никелевых подложках), что в свою очередь приводит к дополнительным шагам по его переносу и т.д. Наряду с графеном, перспективным является исследование нейросовместимости тонких пленок на основе пиролитического углерода. В отличие от графена, такие структуры легко синтезировать на различных диэлектрических подложках с дополнительной возможностью контроля как толщины получаемого покрытия, так и рельефа на наноуровне. Данное обстоятельство делает пиролитический углерод особенно многообещающим материалом для выращивания нервных клеток, поскольку наличие неровностей может существенно менять поведение нейронов на поверхности.

Целью данной работы было создание субстрата, покрытого пленкой пиролитического углерода и изучение особенностей культивирования нейронов на нем. Синтез тонких пленок пиролитического углерода (в работе использовались пленки толщиной 20 и 40 нм) проводили методом химического осаждения из газовой фазы (CVD) в атмосфере метана и водорода (соотношение  $H_2/CH_4$  20:5) при температуре 1050 °С. В качестве подложек использовались кварцевые пластинки толщиной 0.5 мм. Образцы помещали в чашки Петри в среде культивирования нейронов и осуществляли посев диссоциированных нейронов коры головного мозга крысы как непосредственно на субстрат с углеродной пленкой, так и с дополнительным покрытием фактором адгезии – поли-D-лизином. Образцы с клетками культивировали в пластиковых чашках Петри в  $CO_2$ -инкубаторе при температуре 37 °С в течение 14 дней.

Как показано на рис. 1а, после высевания нейроны прикреплялись к подложке в виде одиночных клеток и небольших кластеров из нескольких клеток и начинали формировать отростки (нейриты). Вид культуры нейронов через 14 дней культивирования на поверхности чашки Петри, покрытой поли-D-лизином и на пиролитическом углеродном субстрате, покрытом поли-D-лизином, показан на рисунках 1б и 1в, соответственно. Анализируя полученные изображения можно сделать вывод, что нейроны в процессе культивирования равномерно покрывали поверхность и образовывали сеть с развитой системой нейритов. Как следует из рис. 1г, на аналогичном субстрате без дополнительного покрытия через 14 дней культивирования нейроны образовывали крупные трехмерные кластеры, которые соединялись длинными прямыми пучками нейритов с низкой степенью ветвления. Связи между некоторыми кластерами на поздних этапах культивирования располагались над поверхностью подложки. В целом, на более толстом покрытии из пиролитического углерода (40 нм) нейроны образовывали более плотную и развитую сеть. На более тонком покрытии (20 нм) прослеживалась тенденция к постепенному откреплению клеток.

Сформировавшаяся на покрытых поли-D-лизином поверхностях однородная нейронная сеть соответствует типичной культуре нейронов, растущих на покрытии, к которому клетки обладают высокой адгезией. Клетки при этом имеют «распластанный» вид и равномерно распределяются по поверхности. В случае же роста на пиролитическом углероде (без дополнительного покрытия) адгезия клеток к поверхности ниже и происходит образование клеточных агрегатов. Таким образом, нейроны обладают достаточной адгезией к синтезированному углеродному покрытию для роста и формирования нейронной сети. В то же время, адгезия клеток непосредственно к пиролитическому

му углероду ниже, чем к поли-D-лизину, что объясняет наблюдаемую тенденцию к образованию кластеров клеток.



**Рисунок – Рост нейронов на поверхности пиролитического углерода на второй день культивирования (а), на поверхности чашки Петри, покрытой поли-D-лизином, на 14-й день культивирования (б), на поверхности пиролитического углерода, покрытого поли-D-лизином, на 14-й день культивирования (в) и на поверхности пиролитического углерода без дополнительного покрытия на 14-й день культивирования (г).**

Таким образом, в данной работе продемонстрирована биосовместимость покрытия на основе пиролитического углерода по отношению к нейронам, что открывает дополнительные возможности применения этого материала как в качестве покрытия рабочих компонентов микроэлектродов, так и в других приложениях, требующих создания интерфейса с нервными клетками. Одним из факторов, который влияет на сродство нейронов к поверхности, является рельеф. Путем изменения условий синтеза пиролитического углерода можно варьировать степень шероховатости получаемой поверхности. Дальнейшие исследования углеродных покрытий с различным рельефом являются перспективными для разработки методов биоинженерии нейронных сетей с различной топологией. Так, нейронная сеть, состоящая из крупных кластеров с небольшим числом связей должна обладать более предсказуемым ответом на внешние стимулирующие воздействия.

#### **Список использованных источников**

1. Kilic O. et al. Brain-on-a-chip model enables analysis of human neuronal differentiation and chemotaxis // *Lab Chip*. 2016, 16(21), 4152-4162.
2. Jahromi MA. Et al. Microfluidic Brain-on-a-Chip: perspectives for mimicking neural system disorders // *Mol Neurobiol*. 2019, 56(12), 8489-8512.
3. Burnstine, Townley A. et al. Conductive scaffolds for cardiac and neuronal tissue engineering: governing factors and mechanisms // *Adv Funct Materials*. 2019, 1901369.
4. Farrukh A. et al. Microenvironments designed to support growth and function of neuronal cells // *Front. Mater*. 2018, 5, 1–22.

УДК 611.612.08

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ ОСТЕОАРТРИТОВ

**И.В. Коктыш<sup>1</sup>, П.Т. Журко<sup>1</sup>, Р.М. Смолякова<sup>1</sup>, В.Т. Коктыш<sup>2</sup>, О.М. Липницкий<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова БГУ  
Белорусского государственного университета, Минск

<sup>2</sup>Учреждение здравоохранения «11-ая городская клиническая больница», Минск, Беларусь  
drkoktysz@gmail.com

Изучена экспрессия циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в плазме периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с деформирующими заболеваниями суставов. Выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости и let-7e в периферической крови пациентов с остеоартритами ( $p < 0,05$ ). Определено участие let-7e в формировании метаболического синдрома, осложняющего течение основного заболевания опорно-двигательного аппарата. Найдена связь степени тяжести заболевания с особенностями уровней экспрессии циркулирующих в периферической крови и синовиальной жидкости miR-140 и let-7e.

*Ключевые слова:* остеоартрит, метаболический синдром, биомаркер, микроРНК, синовиальная жидкость, периферическая кровь, прогноз течения.

Остеоартрит (ОА), или деформирующий ОА – дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, характеризующееся выраженным болевым синдромом, ограничением подвижности и приводящее в большинстве случаев к инвалидности при несвоевременной диагностике и некорректном лечении. Считается, что ОА наиболее распространен в основном среди лиц пожилого возраста, однако в настоящее время данная форма патологии суставов все чаще встречается у молодых людей. Заболеваемость ОА продолжает расти, поражая миллионы людей, и становясь одним из самых распространенных хронических расстройств здоровья во всем мире, в том числе и в Республике Беларусь. Существует предположение, что такая тенденция может быть связана с увеличением продолжительности жизни людей в развитых странах [1,2].

Около 50% случаев ОА связаны с генетическим фактором риска, остальные 50% обусловлены другими причинами [1], среди которых к наиболее значимым факторам риска ОА относят ожирение и нарушение обмена веществ, что подтверждается ростом заболеваемости ОА во всем мире на фоне увеличения числа лиц с лишней массой тела и ожирением [3]. Кроме того, ожирение тесно ассоциировано не только с фактом наличия ОА, но и с его прогрессией, а некоторые авторы предполагают участие адипокинов в формировании болевого синдрома и последующей инвалидизации [4]. Следует отметить, что выраженный болевой синдром при ОА приводит к снижению физической активности пациентов и выраженной гиподинамией, что в свою очередь усиливает выраженность метаболических нарушений, в том числе способствуя увеличению массы тела пациентов. Таким образом, формируется «порочный круг» [2].

Становится очевидной необходимость изучения молекулярных механизмов патогенеза, а также усовершенствования диагностическим мероприятий ОА. Особое место среди биомаркеров ОА, позволяющих осуществлять раннюю диагностику и прогноз ОА, занимают микроРНК [1, 5]. Несмотря на то, что микроРНК не кодируют белки, они регулируют уровень экспрессии генов [1]. МикроРНК вызывают особый интерес у исследователей из различных областей биологии и медицины благодаря консервативности их структуры и вероятности определения взаимосвязи патологических процессов через изучение микроРНК [5].

Определение уровня экспрессии микроРНК может быть использовано для ранней диагностики ОА, оценки степени тяжести течения и прогноза заболевания. Полученные результаты могут стать основой для дальнейшего изучения патофизиологических связей заболеваний опорно-двигательного аппарата с другими патологическими состояниями. Например, установлено, что miR-22, miR-103, miR-25, miR-337 и miR-29a коррелируют с индексом массы тела, что предполагает потенциальную роль этих микроРНК в метаболизме липидов и развитии ОА. Однако точных данных, описывающих связь метаболического синдрома (МС) и деформирующих заболеваний су-

ставов на молекулярно-генетическом уровне до сих пор нет. Активное изучение связи метаболических особенностей индивидуума и формирования ОА делает возможным открытие биомаркеров ОА [1].

miR-140 – основная микроРНК, принимающая участие в процессах хондрогенеза. Предполагается что уровни экспрессии miR-140-5p и -3p хондроцитами значительно снижаются в случае формирования ОА [6]. Дефицит miR-140, в свою очередь, ускоряет дифференцировку хондроцитов в гипертрофические, ингибирует дифференцировку покоящихся хондроцитов в столбчатые пролиферирующие хондроциты, а также способствует аномальной экспрессии генов во время развития ОА.

Потенциальным прогностическим маркером тяжести коксартроза и гонартроза на фоне метаболического синдрома может стать микроРНК let-7e. Известно, что повышенная экспрессия let-7e ассоциирована с уровнем липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, повышенными значениями артериального давления и количеством симптомов при МС. Кроме того, предполагается участие let-7e в регуляции активности инсулина и связь уровня ее экспрессии с тяжестью ОА коленного и тазобедренного суставов [5, 7].

**Цель исследования** – установить особенности экспрессии циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в синовиальной жидкости и плазме крови пациентов с деформирующими заболеваниями суставов, ассоциированных с МС.

**Материалы и методы исследования.** С информированного согласия исследуемую группу составили 17 пациентов с ОА, осложненными МС, подвергавшихся артроскопии или тотальному эндопротезированию суставов (в том числе 13 женщин, 4 мужчины; возраст 60,0 [55,0;67,0]). Из них 11 пациентов с гонартрозом (в том числе 8 женщин, 3 мужчины; возраст 57,0 [51,0;67,0]) и 6 – с коксартрозом (в том числе 5 женщин, 1 мужчина; возраст 64,5 [60,0;69,0]). 7 пациентов с отсутствием рентгенологических и клинических признаков ОА и МС, также перенесших оперативное вмешательство на суставах, составили группу сравнения (в том числе 4 женщины, 3 мужчины; возраст 49,0 [26,0;57,0]).

Объект исследования: периферическая кровь и синовиальная жидкость. Забор исследуемого материала проводился во время оперативного вмешательства. Результаты общеклинических, биохимических исследований мочи и крови, а также коагулограммы получены сотрудниками клинико-диагностической лаборатории Учреждения здравоохранения «11-я городская клиническая больница» г. Минска.

Для оценки уровня экспрессии изучаемых микроРНК в биологических жидкостях пациентов с ОА использовался адаптированный нами протокол молекулярно-генетического исследования («miRNeasy Serum / Plasma Kit», Qiagen, Германия): микроРНК определялась в двухшаговой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первый этап – этап обратной транскрипции (miRCURY LNA RT Kit, Qiagen, Германия), второй – ПЦР в режиме реального времени (miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Германия). Исследовались циркулирующие микроРНК: hsa-miR-140-5p (MIMAT0000431) и hsa-let-7e-5p (MIMAT0000066). Полученные значения Ct нормализовались по Ct малой ядерной РНК U6. Для оценки уровней экспрессии микроРНК был использован метод  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Полученные результаты лабораторных исследований биологических жидкостей пациентов обеих групп были проанализированы с помощью непараметрических методов статистического анализа программы «Statistica 8.0». Критический уровень значимости  $p$  нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Изучена экспрессия циркулирующих микроРНК miR-140 и let-7e в плазме периферической крови и синовиальной жидкости пациентов с деформирующими заболеваниями суставов, ассоциированных с метаболическим синдромом (таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Анализ экспрессии циркулирующих miR-140 и let7-е в периферической крови у пациентов с ОА и группы сравнения

Клинический диагноз / группа	$\Delta C_T$ (miR-140)	$\Delta C_T$ (let-7e)	$\Delta\Delta C_T$ (miR-140)	$\Delta\Delta C_T$ (let-7e)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (miR-140)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (let-7e)
ОА	19,50 [19,19; 20,57]	17,57 [16,99; 17,94]	16,64 [3,56; 19,40]	16,32 [1,85; 17,66] <b>*p=0,03 (U)</b>	0,03 [0,00; 1,00]	0,00 [0,00; 0,28] <b>*p=0,03 (U)</b>
Группа сравнения	20,74 [19,86; 21,36]	17,46 [17,27; 17,74]	1,42 [-0,40; 10,32]	0,86 [-0,62; 1,94]	0,46 [0,09; 1,54]	0,55 [0,26; 1,54]

Примечание: указаны медианы и процентиля [25%; 75%], \* – U-критерий Манна-Уитни,  $\Delta C_T$  – коэффициент нормализации микроРНК,  $\Delta\Delta C_T$  – разница коэффициентов нормализации,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  – кратность изменения уровня экспрессии гена (относительная экспрессия).

Таблица 2 – Анализ экспрессии циркулирующих miR-140 и let7-е в синовиальной жидкости пациентов с коксартрозом и группы сравнения

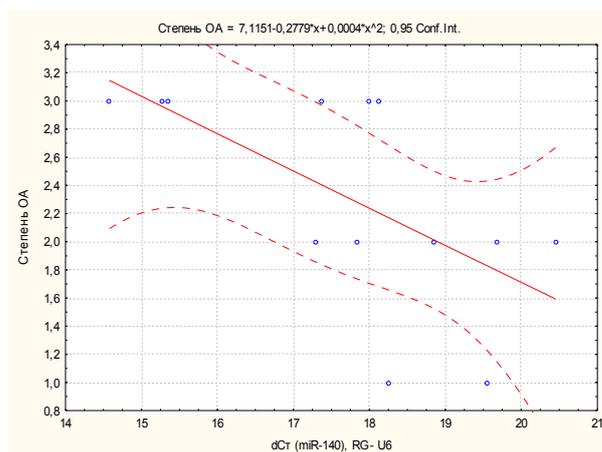
Клинический диагноз / группа	$\Delta C_T$ (miR-140)	$\Delta C_T$ (let-7e)	$\Delta\Delta C_T$ (miR-140)	$\Delta\Delta C_T$ (let-7e)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (miR-140)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ (let-7e)
Коксартроз	15,36** [15,28; 17,37] <b>*p=0,04 (Z)</b>	13,82 [13,69; 13,83]	-3,19 ** [-3,27; 1,18] <b>*p=0,04 (Z)</b>	-1,73 [-1,86; -1,72]	9,13 [2,27; 9,65] <b>*p=0,04 (Z)</b>	3,32 [3,29; 3,63]
Группа сравнения	19,17 [18,85; 20,46]	16,07 [15,73; 16,55]	0,62 [0,30; 1,92]	0,52 [0,18; 1,00]	0,65 [0,26; 0,81]	0,70 [0,50; 0,88]

Примечание: указаны медианы и процентиля [25%; 75%], \* – Z-критерий Вальда-Вольфовица,  $\Delta C_T$  – коэффициент нормализации микроРНК,  $\Delta\Delta C_T$  – разница коэффициентов нормализации,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  – кратность изменения уровня экспрессии гена (относительная экспрессия).

Анализ данных молекулярно-генетического исследования плазмы пациентов с деформирующими заболеваниями суставов не выявил статистически значимых изменений в отношении экспрессии miR-140 по сравнению с аналогичным показателем в группе сравнения (таблица 1). Считается, что miR-140 необходим для адипогенеза и его пониженные уровни могут быть обнаружены в плазме периферической крови пациентов с патологическим ожирением, подтверждая участие miR-140 в метаболических процессах и ожирении, основных участниках развития ОА [8].

Установлено статистически значимое снижение относительной экспрессии циркулирующей микроРНК let-7e в периферической крови в группе пациентов с ОА (p=0,03, таблица 1). Результаты особенностей экспрессии let-7e в периферической крови при наличии деформации суставов могут быть ассоциированы с МС и сопутствующим ОА, что косвенно свидетельствует об участии let-7 в формировании и развитии системного воспаления и ОА в целом.

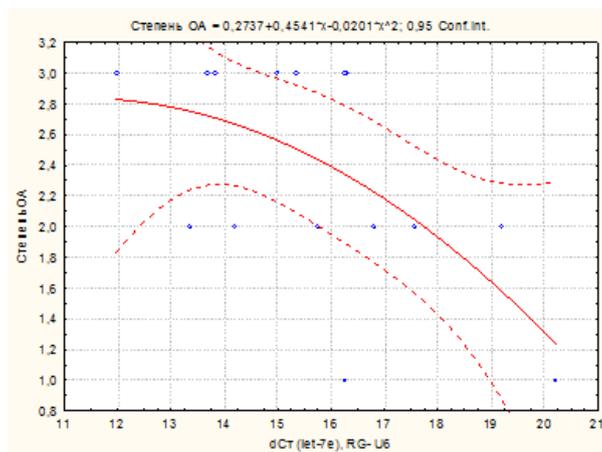
В синовиальной жидкости пациентов с ОА обнаружено статистически значимое снижение уровня экспрессии микроРНК miR-140 (p=0,03), коррелирующее со степенью активности заболевания (Rs=-0,65, p=0,02, рисунок 1).



**Рисунок 1. – Взаимосвязь уровня экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости со степенью активности заболевания у пациентов с ОА.**

Выявлена тенденция к увеличению кратности изменения экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости исследуемой группы пациентов относительно группы сравнения ( $p=0,08$ ). Кроме того, у пациентов с коксартрозом найдено статистически значимое более чем пятикратное подавление экспрессии miR-140 в синовиальной жидкости ( $p=0,03$ , таблица 2). При этом исследование синовиальной жидкости пациентов с ОА, осложненными МС, на предмет особенностей экспрессии let-7e статистически значимых различий не показало.

Описывается ассоциация let-7e с развитием тяжелого течения при ОА: снижение экспрессии let-7e указывает на высокую вероятность артропластики [9,10]. Нами также выявлена статистически значимая умеренная обратная корреляционная связь между уровнем экспрессии let-7e в синовиальной жидкости и степенью активности деформирующего заболевания суставов ( $R_s=-0,53$ ,  $p=0,03$ , рисунок 2).



**Рисунок 2. – Взаимосвязь уровня экспрессии let-7e в синовиальной жидкости пациентов со степенью активности заболевания при ОА**

Клинико-лабораторные исследования периферической крови пациентов с ОА, осложненными МС, показали изменения, характерные для воспалительного процесса, среди которых отмечено статистически значимое увеличение количества лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов ( $p<0,05$ , соответственно).

Установлена прямая сильная статистически значимая связь между уровнем экспрессии miR-140 и количеством нейтрофилов ( $R_s=0,9$ ,  $p<0,05$ ) в периферической крови у пациентов с гонартрозом, а коэффициент нормализации let-7e прямо коррелировал с относительным количеством моноцитов ( $R_s=0,7$ ,  $p<0,05$ ) и обратно – со средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах ( $R_s=-0,8$ ,  $p<0,05$ ). Кроме того, у пациентов с коксартрозом установлена прямая корреляция между уровнем экспрессии miR-140 в плазме и средней концентрацией гемоглобина в эритроцитах ( $R_s=0,9$ ,

$p < 0,05$ ) и обратная – между относительным изменением экспрессии let-7e и средним содержанием гемоглобина в эритроците ( $R_s = -0,9$ ,  $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Таким образом, развитие остеоартрита сопровождается снижением уровня экспрессии микроРНК miR-140 в синовиальной жидкости, коррелирующее со степенью активности заболевания. Для пациентов с остеоартритами характерно снижение относительной экспрессии циркулирующей микроРНК let-7e в периферической крови, связанное со степенью тяжести деформирующих изменений в суставах.

Полученные результаты могут быть использованы в практической медицине (в ревматологии и ортопедии) для ранней диагностики остеоартритов, оценки степени тяжести течения и прогноза заболевания, а также для прогнозирования необходимости эндопротезирования суставов.

#### Список использованных источников

1. Kapoor, M. osteoarthritis: pathogenesis, diagnosis, available treatments, drug safety, regenerative and precision medicine / М. Kapoor, N.N. Mahomed. – Switzerland : Springer International, 2015. – 283 P.
2. Васильева, Л.В. Влияние метаболического синдрома на клиническую картину остеоартроза / Л.В. Васильева, Д.И. Лахин // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 8–10.
3. Fatty acids and osteoarthritis: different types, different effects / L. Marieke [et al.] // Joint Bone Spine. – 2019. – Vol. 86, № 4. – P. 451–458.
4. Differential involvement of synovial adipokines in pain and physical function in female patients with knee osteoarthritis. A cross-sectional study / J. Calvet [et al.] // Osteoarthritis and Cartilage. – 2018. – Vol. 26. – P. 276–284.
5. Yu Y. Modulated autophagy by microRNAs in osteoarthritis chondrocytes / Y.Yu, J. Zhao // Bio-med Res Int. – 2019. – Vol. 2019. – DOI: 10.1155/2019/1484152.
6. Potential novel prediction of TMJ-OA: miR-140-5p regulates inflammation through Smad/TGF- $\beta$  signaling / W. Li [et al.] // Front Pharmacol. – 2019. – Vol. 10. – DOI: 10.3389/fphar.2019.00015.
7. Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis / L. Nguyen [et al.] // International Int J Mol Sci. – 2017. – Vol. 18, № 3. – DOI: 10.3390/ijms18030601.
8. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes / E. Ntoumou L. Feng [et al.] // Clin Epigenetics. – 2017. – Vol. 9. – DOI: 10.1186/s13148-017-0428-1.
9. Dysregulation of both miR-140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity / С-М. Yin [et al.] // Bone Joint Res. – 2017. – Vol. 6, № 11. – P. 612–618.
10. Circulating microRNA let-7e is decreased in knee osteoarthritis, accompanied by elevated apoptosis and reduced autophagy / L. Feng [et al.] // Int J Mol Med. – 2020. – Vol. 45, № 5. – P. 1464–1476.
11. Szunerits S, Boukherroub R. Graphene-based biosensors // Interface Focus 2018, 8, 20160132.

УДК 611.612.06

#### АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ СИСТЕМНОГО КРОВОТОКА: СВЯЗЬ С ПРОЦЕССОМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

**И.В. Кондакова<sup>1</sup>, Г.В. Какурина<sup>1</sup>, И.А. Бахронов<sup>1</sup>, О.В. Черемисина<sup>1</sup>, Е.Л. Чойнзонов<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>НИИ онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО СибГМУ, Томск, Россия

kondakova@oncology.tomsk.ru

Опухолевая прогрессия, включающая инвазию и метастазирование, является главной причиной смертности от злокачественных новообразований. Один из основных механизмов опухолевой прогрессии – приобретение опухолевыми клетками подвижности. Клеточная подвижность необходима для инвазии опухолевых клеток в нормальные ткани и для диссеминации опухолевых клеток через лимфатическую или кровеносную систему. В настоящее время известно, что процесс клеточной подвижности регулируется актин-связывающими белками, осуществляющими ассоци-

ацию/диссоциацию актиновых филаментов между собой и с клеточной мембраной (Александрова А.Ю. 2014., Бочкарева Н.В., 2011).

К актинсвязывающим белкам относится мало изученный белок CAP1 - аденилилциклаза ассоциированный протеин 1, увеличение содержания которого в сыворотке крови нами было предварительно показано протеомными методами у больных раком гортани [Какурина Г.В., 2015]. CAP1 способен взаимодействовать с актином, в частности с гамма-актином, который характерен для мышечных клеток. CAP1 имеет N-концевой домен, требующийся для нормального функционирования аденилилциклазы, и C-концевой домен, связанный с актином, который регулирует реконструкцию актина в ответ на клеточные сигналы и требуется для нормальной клеточной морфологии, клеточного деления, роста и передвижения у эукариот [Какурина Г.В. 2018]. Известно, что CAP1 экспрессируется эпителиальными клетками дыхательных путей, причем низкая экспрессия этого белка связана с миграцией альвеолоцитов и высокой экспрессией MMP-9 при ХОБЛ [Xie S.S., 2014]. Функциональными партнерами для CAP1 являются актин-связывающие белки кофилин 1 и профилин 1 [Polachini G. M., 2012]. Так, протеомными методами показаны существенные различия между малоинвазивным и агрессивным типом плоскоклеточного рака полости рта в отношении белков, ассоциированных с организацией цитоскелета в том числе CAP1 и кофилином-1 [Polachini G. M., 2012]. Чрезмерная экспрессия кофилина 1 была обнаружена в различных типах злокачественных опухолей [Lee MH, 2019; Qin Y, 2019]. Было показано, что в некоторых солидных опухолях человека, таких как рак молочной железы, поджелудочной железы и рак печени экспрессия профилина 1 снижена, так как избыточная экспрессия этого белка может ингибировать пролиферацию и миграцию этих раковых клеток. Предполагается, что профилин 1 может выступать в качестве белка - супрессора опухолей. В противоположность этому, есть данные о сверхэкспрессии профилина 1 при почечно-клеточной карциноме и карциноме гортани [Ding Z, 2014; Adami GR, 2017]. Эзрин способствует метастазированию опухоли, однако молекулярные механизмы этого до сих пор до конца не изучены. Так, например, на клетках назофарингиальной карциномы *NGX6b* in vitro показано, что эзрин играет важную роль в процессах инвазии и метастазирования [Wang L, 2014].

В литературе представлены весьма скудные данные о возможности присутствия АСБ в сыворотке крови. Предполагается, что актиновый цитоскелет играет важную роль в выживании циркулирующих в кровеносных сосудах опухолевых клеток, поскольку он позволяет создавать продуктивные связи с клетками крови [Machesky L.M., 2008].

В представленной работе изучали уровень актин-связывающих белков: фасцина 1, CAP1, профилина 1, эзрина и кофилина в сыворотке крови в зависимости от метастазирования и инвазивного роста злокачественных опухолей гортани. Содержание актин-связывающих белков в тканях и сыворотке крови определяли иммуноферментным методом. В исследование вошла сыворотка крови 42 больных, в группу контроля вошли практически здоровые волонтеры без клинически выявленных опухолевых процессов и хронических заболеваний в стадии обострения.

Сравнительный анализ содержания циркулирующих АСБ в системном кровотоке показал, что уровень CAP1 значимо был выше в группе больных раком гортани, чем в группе здоровых доноров (Табл. 1).

Таблица 1. – Содержание актин-связывающих белков в сыворотке крови больных раком гортани

Ng/ml	Контроль	рак	P	P
	N=15	N=41	U-test	Median Test
CFL1	0.84(0.77;0.93)	0.80(0.63;1.14)	0.41	0.053
FSCN1	5.46(3.65;6.9)	1,8(0.43;8.1)	0.07	0.08
CAP1	0.025(0.02;0.028)	0.11(0.08;1.15)	0.001	0.000
EZR	2.3(1.9;2.5)	2.1(1.69;2.56)	0.89	0.1
PFN1	0.26(0.22;0.29)	0.28(0.23;0.38)	0.06	0.08

Примечания: P – достоверность различий в группах. CFL1 – кофилин1, FSCN1 – фасцин1, CAP1 - аденилилциклаза ассоциированный протеин 1, EZR – эзрин, PFN1- профилин1.

Изучение уровня актин-связывающих белков в зависимости от стадии заболевания показало повышение уровня фасцина в 10 раз в группе больных раком гортани с лимфогенными метастазами по сравнению с неметастазирующими опухолями. Развитие лимфогенных метастазов приводило к повышению содержания CAP1 на 40% в ткани первичной опухоли по отношению к группе боль-

ных без метастазов (Табл. 2). Корреляционный анализ результатов также показал, что с наличием лимфогенных метастазов положительно коррелировал уровень фасцина ( $r=0,4$ ,  $p=0,04$ ) и уровень CAP1 ( $r=0,3$ ,  $p=0,05$ ).

Полученные данные отражают положение о том, что формирование метастатического потенциала трансформированной клетки тесно связано с ремоделированием цитоскелета [Какурина Г.В., 2012]. Кроме того, нами показано, что такие циркулирующие актин-связывающие белки системного кровотока, как фасцин и CAP1 связаны с метастазированием рака гортани.

Таблица 2. – Содержание актин-связывающих белков в сыворотке крови в зависимости от наличия лимфогенных метастазов

ng/ml	T2-4N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> , N=27	T2-4N <sub>1</sub> -2M <sub>0</sub> , N=19	P, U-test
CFL1	0,83(0,60;1,03)	0,9(0,65;1,28)	0,42
FSCN1	0,64(0,34;7,43)	6,73(6,14;8,3)	0,02
CAP1	0,09(0,07;0,14)	0,14(0,07;0,20)	0,05
EZR	2,12(1,54;2,60)	2,2(1,89;2,50)	0,83
PFN1	0,34(0,28;0,41)	0,26(0,23;0,33)	0,06

Примечание: P – достоверность различий между группами

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о вовлечении CAP1 в канцерогенез злокачественных опухолей и позволяют сделать фундаментальные выводы о важном вкладе актин-связывающих белков в инвазию и метастазирование опухолей. В этой связи, актуальны исследования новых сывороточных молекулярных маркеров для прогнозирования метастазирования рака, что позволит улучшить результаты лечения онкологических больных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00151 А).

#### Список использованных источников

1. Александрова А.Ю. 2014. Пластичность миграции опухолевых клеток: приобретение новых свойств или возврат к «хорошо забытым» старым? *Биохимия*. 79, № 9, 1169-1187.
2. Бочкарева Н.В., Кондакова И.В., Коломиец Л.А. Роль актин-связывающих белков в клеточном движении и при опухолевом росте. *Молекулярная медицина*. 2011. № 6. С. 14-18.
3. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л. Аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1 в развитии плоскоклеточных карцином головы и шеи. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015. Т. 160. № 11. С. 648-651.
4. Какурина Г.В., Колегова Е.С., Кондакова И.В. Аденилатциклаза-ассоциированный протеин 1: структура, регуляция и участие в клеточных процессах. *Биохимия*. 2018. Т. 83. № 1. С. 127-136.
5. Xie SS, Hu F, Tan M, Duan YX, Song XL, Wang CH. *Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 and adenylyl cyclase-associated protein 1 in chronic obstructive pulmonary disease*. *J Int Med Res*. 2014. 42(6), P. 1272-84.
6. Polachini GM, Sobral LM, Mercante AM, Paes-Leme AF, Xavier FC, Henrique T, Guimarães DM, Vidotto A, Fukuyama EE, Góis-Filho JF, Cury PM, Curioni OA, Michaluart P Jr, Silva AM, Wünsch-Filho V, Nunes FD, Leopoldino AM, Tajara EH. Proteomic approaches identify members of cofilin pathway involved in oral tumorigenesis. *PLoS One*. 2012;7(12):e50517.
7. Lee MH, Kundu JK, Chae JI, Shim JH. *Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer*. *Arch Pharm Res*. 2019. 6, 481-49.
8. Qin Y, Li W, Long Y, Zhan Z. *Relationship between p-cofilin and cisplatin resistance in patients with ovarian cancer and the role of p-cofilin in prognosis*. *Cancer Biomark*. 2019; 24(4), 469-475.
9. Ding Z, Joy M, Bhargava R, Gunsaulus M, Lakshman N, Miron-Mendoza M, Petroll M, Condeelis J, Wells A, Roy P. Profilin-1 downregulation has contrasting effects on early vs late steps of breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2014; 33(16), 2065-74.
10. Adami GR, O'Callaghan TN, Kolokythas A, Cabay RJ, Zhou Y, Schwartz JL. A loss of profilin-1 in late-stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2017. 7, 489-495.

11. Wang L, Li X, Xiang B, Zhou M, Li X, Xiong W, Niu M, Wei P, Wang Z, Wang H, Chen P, Shen S, Peng S, Li G. NGX6a is degraded through a proteasome-dependent pathway without ubiquitination mediated by ezrin, a cytoskeleton-membrane linker. *J Biol Chem.* 2014. 289(52). 35731-42.

12. Machesky LM. Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. *FEBS Lett.* 2008.582(14):2102-11.

13. Какурина Г.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Прогнозирование метастазирования плоскоклеточных карцином головы и шеи. // *Вопросы онкологии.* 2012. Т. 58. № 1. С. 26-32.

УДК 611.612.06

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАФЕНОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

Т.А. Кулагова<sup>1</sup>, Е.Н. Голубева<sup>1</sup>, Ю.Д. Король<sup>1</sup>, К.Н. Борисов<sup>1,2</sup>, В.В. Екимчик<sup>2</sup>,  
С.В. Корень<sup>3</sup>, Е.Г. Фомина<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем»  
Белорусского государственного университета, Минск, tatyana\_kulagova@tut.by*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Минск*

<sup>3</sup>*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,  
Минск, Беларусь*

Использование наноразмерных структур и материалов для разработки новых терапевтических подходов противоопухолевой терапии является одним из наиболее перспективных направлений развития медицины. Применение подобных материалов в фармацевтических целях позволяет улучшать фармакологические свойства препаратов, изменять профили распределения и фармакокинетики препарата в организме, а также предоставляет возможность для направленной доставки лекарственных средств. На сегодняшний день для целей наномедицины разрабатываются и успешно используются целый ряд наноструктур, которые можно использовать в комплексе с лекарственными веществами. При этом разработка лекарственных форм предполагает возможность модификации как структурных, в том числе поверхностных, так и физико-химических свойств наночастиц для достижения максимальной эффективности терапии.

Одним из перспективных наноматериалов для разработки лекарственных форм препаратов являются графеновые квантовые точки (ГКТ), состоящие из нескольких (до 10) sp<sup>2</sup>-гибридизированных листов графена, с латеральным размером от нескольких до 10 нм. ГКТ могут быть синтезированы либо путем сборки небольших молекул, таких как лимонная кислота и глюкоза (подход «снизу вверх»), либо путем разрушения более крупных предшественников, таких как оксид графена (подход «сверху вниз»). Функционализированные ГКТ (гидроксильными, карбонильными, карбоксильными группами) обладают высокой стабильностью, низкой токсичностью, хорошей биосовместимостью, флуоресценцией [1].

Спектрально-флуоресцентные характеристики ГКТ обусловлены их размером, способом синтеза и функционализацией [1-3]. Данные структуры исследуют на применимость для визуализации клеток и тканей, адресной доставки лекарств при терапии онкологических заболеваний [1, 4], в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии [1, 5]. Помимо этого, ГКТ могут действовать как доноры и акцепторы электронов, что указывает на их антиоксидантный потенциал. Было продемонстрировано, что при действии лазерного излучения ГКТ способны как утилизировать, так и производить активные формы кислорода (АФК) в бесклеточных системах [6].

Известно, что ГКТ могут проникать через гематоэнцефалический барьер и потенциально могут использоваться в лечении опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний [1]. Показано, что ГКТ с разными функциональными группами обладают низкой цитотоксичностью, значительное снижение пролиферации клеток карциномы легких человека A549 и глиомы крысы C6 было зарегистрировано для аминокислотсодержащих ГКТ в концентрации 200 мкг/мл [7]. В экспериментах *in vivo* на мышях было показано, что ГКТ не оказывают токсического воздействия и в течение 24 ч выводятся из организма [8].

Целью данной работы было определение спектрально-флуоресцентных характеристик ГКТ при взаимодействии с компонентами плазмы крови, а также исследование влияния этих нанобъектов на жизнеспособность опухолевых клеток.

В работе были использованы ГКТ производства Sigma (USA) диаметром менее 5 нм, квантовый выход  $\geq 17\%$ . Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции измеряли в водных растворах белков и плазме крови с использованием спектрофотометра PV1251 и спектрофлуориметра CM 2203 («Солар», Беларусь). Содержание плазмы в образце составило 5 %. Концентрация альбумина в растворе составляла 1,5 г/л, концентрация фибриногена – 1 г/л. Гемоглобин выделяли из эритроцитов путем лизиса эритроцитов в гипотоническом растворе (воде), анализ концентрации и типа гемоглобина проводили спектрофотометрически до и после добавления ГКТ. Концентрацию мет-гемоглобина определяли по формуле (1)

$$[\text{MetHb}] = 0,02 D_{577} - 0,04 D_{569} - 0,033 D_{500} \quad (1)$$

где,  $D_{577}$ ,  $D_{569}$ ,  $D_{500}$  — оптическая плотность образцов при длинах волн 577, 569, 500 нм соответственно.

Клетки почки мартовки Vero и глиомы крысы линии C6 получены из коллекции культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Клетки культивировали в среде Игла DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и  $1 \cdot 10^4$  г/л гентамицина. Культивирование клеток проводили в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре  $37^\circ\text{C}$ . ГКТ в концентрации 50 мкг/мл добавляли либо в ростовую среду к клеткам в монослое, либо в суспензию клеток в среде Игла DMEM. Клетки инкубировали с ГКТ 2-4 часа. Цитотоксичность исследовали методом световой микроскопии. Флуоресцентную микроскопию выполняли на микроскопе Nikon Eclipse Ti2, возбуждение светодиодом 470 нм, объектив DIC x60WI .

В соответствии с описанием производителя ГКТ имеют  $\lambda_{\text{ex}}=485$  нм и  $\lambda_{\text{em}}=(530\pm 10)$  нм. В измеренных нами спектрах поглощения ГКТ в водных растворах зарегистрированы максимумы поглощения при 276, 356, 460 и 488 нм. При этом наиболее интенсивное поглощение наблюдается при 276 и 488 нм. Поглощение при 276 нм соответствует  $\pi\text{-}\pi^*$ -переходу  $\text{sp}^2$ -атомов углерода и обусловлен эффектом квантового confinement [9]. Остальные максимумы поглощения отражают переходы  $\text{n-}\pi^*$  и переходы с энергиями близкими и/или промежуточными  $\pi\text{-}\pi^*$ -переходу, в которых участвуют кислородсодержащие функциональные группы ( $\text{C}=\text{O}$  /  $\text{COOH}$ ) на краях и поверхности ГКТ.

Спектры флуоресценции ГКТ 50 мкг/мл при длинах волн возбуждения 273 и 470 нм представлены на рисунке 1. Видно, что для ГКТ в ФБР при обоих типах возбуждения наблюдается максимум при  $\lambda_{\text{em}} = 530$  нм. При добавлении к раствору ГКТ плазмы крови (5%) зарегистрировано снижение флуоресценции, которое проявилось в большей степени для  $\lambda_{\text{ex}} = 273$  нм. Эти же данные подтверждаются спектрами возбуждения ГКТ в растворах, представленными на рисунке 2. Было проведено исследование по установлению роли белков в изменении спектрально-флуоресцентных характеристик ГКТ. Основными белковыми компонентами плазмы являются альбумин, глобулины и фибриноген. Выявлено, что спектральные характеристики ГКТ не меняются в присутствии альбумина.

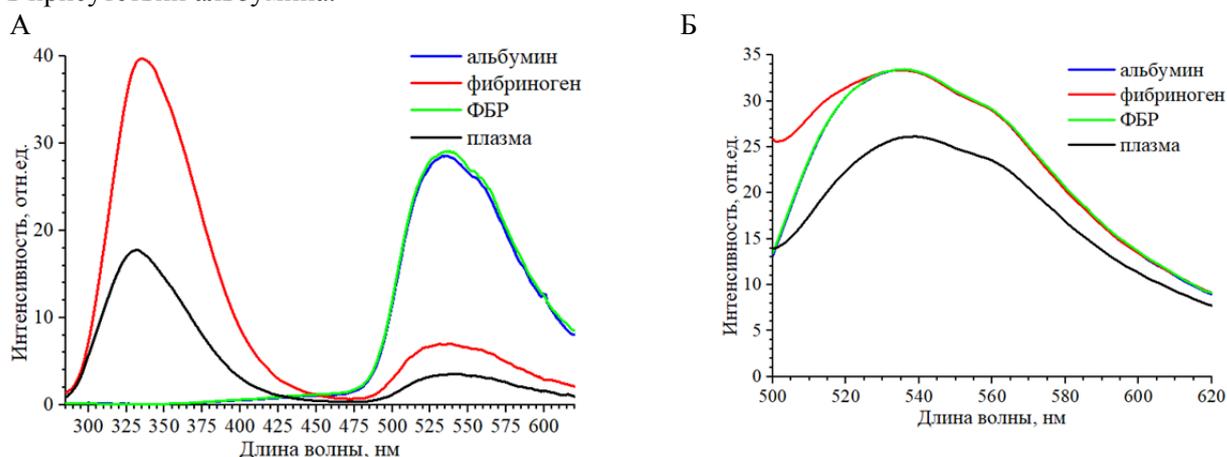
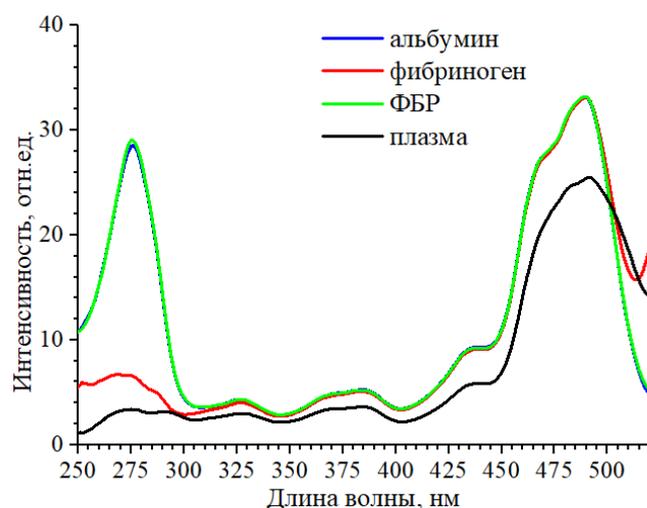


Рисунок 1. – Спектры флуоресценции графеновых квантовых точек в различных средах при возбуждении 273 нм (А) и 490 нм (Б)



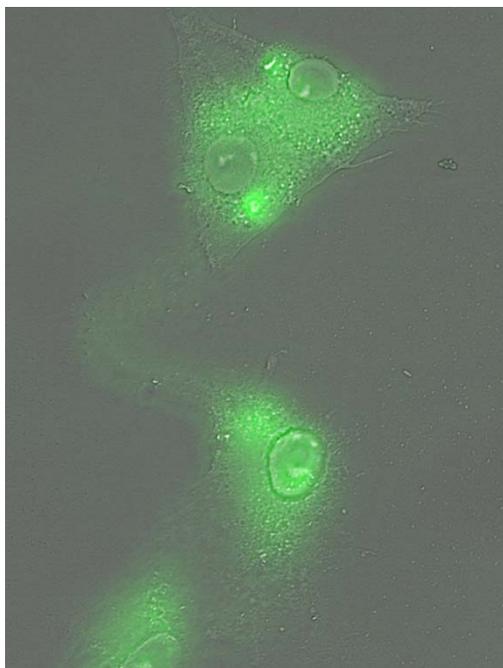
**Рисунок 2. – Спектры возбуждения графеновых квантовых точек в различных средах, регистрацию сигнала осуществляли при 530 нм**

Однако при взаимодействии нанобъектов с фибриногеном происходит снижение интенсивности флуоресценции ГКТ, обусловленной  $\pi$ - $\pi^*$ -переходом  $sp^2$ -атомов углерода. Мы предполагаем, что фибриноген образует комплексы с ГКТ, что приводит к снижению флуоресценции.

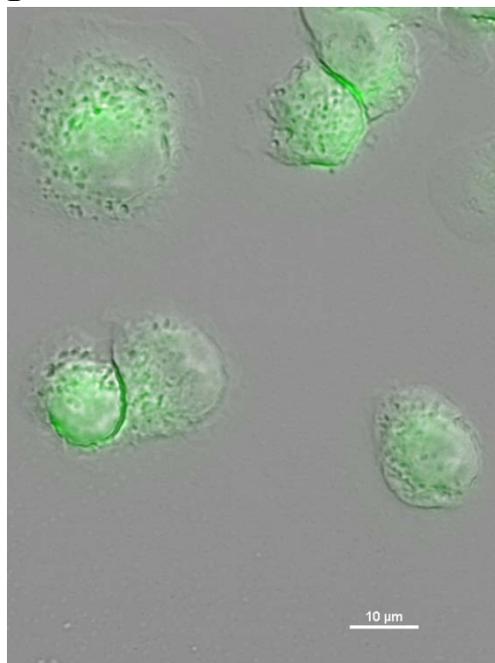
Было проведено исследование о влиянии ГКТ на гемоглобин. Выявлено, что при взаимодействии выделенного из эритроцитов гемоглобина с ГКТ в течение 0,5-4 ч спектральные характеристики белка не меняются и образование метгемоглобина не происходит.

Методом флуоресцентной микроскопии зарегистрировано достаточно равномерное накопление и распределение ГКТ в цитоплазме клеток глиомы крысы линии С6 и клеток Vero после 4 ч взаимодействия с нанобъектами. Данные представлены на рисунке 3. Выявлено, что накопление ГКТ происходит как клетками в монослое, так и клетками в суспензии.

А



Б



**Рисунок 3. – Флуоресцентная микроскопия клеток глиомы крысы линии С6 (А) и клеток Vero (Б), накопивших графеновые квантовые точки. Время инкубирования с нанобъектами 4 ч. Длина волны возбуждения флуоресценции 470 нм.**

Установлено, что накопление визуализируется в клетках уже после 2 ч инкубирования с ГКТ. Видно, что ГКТ локализуются в примембранном слое и цитоплазме клеток. При этом нанобъекты не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки.

Различные исследовательские группы приходили к выводу, что ГКТ обладают низкой токсичностью. Dai et al. показали, что графеновые квантовые точки влияют на жизнедеятельность клеток только при очень высоких концентрациях. Ещё одно исследование показало, что добавление до 400 мг ГКТ к клеткам не привело к значительному угнетению их функциональной активности [4].

Таким образом, получены новые данные о взаимодействии ГКТ с белками плазмы крови. Выявлено, что ГКТ образуют комплексы с фибриногеном, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции нанообъектов. Представляет интерес дальнейшее исследование взаимодействия ГКТ с фибриногеном и выявление роли такого взаимодействия в процессах агрегации тромбоцитов. Установлено, что ГКТ в концентрации 50 мкг/мл не влияют на жизнеспособность опухолевых клеток, и при инкубировании накапливаются в них. Следовательно, ГКТ могут успешно быть использованы в биомедицинской практике для совершенствования фототерапевтических технологий с применением наноразмерных лекарственных форм.

#### Список использованных источников

1. Unravelling the potential of graphene quantum dots in biomedicine and neuroscience. / G. Perini [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, №10. – № 3712.
2. Electrochemical synthesis of small-sized red fluorescent graphene quantum dots as a bioimaging platform // X.Y. Tan, [et al.] // *Chem. Commun.* – 2015. – Vol. 51, №13 – P. 2544.
3. Graphene quantum dots: In the crossroad of graphene, quantum dots and carbogenic nanoparticles / A. Kellarakis // *Curr. Opin. Colloid In.* – 2015. – Vol. 20 – P. 354-361.
4. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices / J. Shen, [et al.]. // *Chemical Communications.* – 2012. – Vol. 48, №31 – P. 3686–3699.
5. Superior photodynamic effect of carbon quantum dots through both type I and type II pathways: Detailed comparison study of top-down-synthesized and bottom-up-synthesized carbon quantum dots / T. Pillar-Little, [et al.]. // *Carbon* – 2018. – Vol. 140. – P. 616-623.
6. Carbon dots as antioxidants and prooxidants / I.L. Christensen, [et al.]. // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 667-76.
7. Cellular distribution and cytotoxicity of graphene quantum dots with different functional groups / X. Yuan [et al.]. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – Vol. 9. – P. 108.
8. In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots / M. Nurunnabi // *ACS Nano* – 2013. – Vol. 7. – P. 6858–6867.
9. Formation mechanism of graphene quantum dots and their edge state conversion probed by photoluminescence and Raman spectroscopy / G. Rajender, P. K. Giri // *J. Mater. Chem.* – 2016. – Vol. 4. – P. 10852.

УДК 611.612.08

### ПОИСК МИКРОБНЫХ ПРОТЕИНАЗ ШИРОКОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

С.А. Кулиш, Л.И. Сапунова, А.Г. Лобанок

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск*

Протеиназы представляют собой большую и разнообразную группу ферментов гидролитического способа действия, которые классифицируются по месту их воздействия на субстрат, структуре активного сайта фермента и механизмам реакции [1]. Протеолитические ферменты на биохимическом и/или физиологическом уровне принимают участие в функционировании отдельных клеток и целых организмов: они регулируют основные функции дифференциации клеток, их подвижность, деление и гибель. Участвуют во внутриклеточных процессах деградации белков, в которых задействованы лизосомы и протеасомная система [2, 3]. Протеолиз является основой ковалентной активации, регуляции и ингибирования ферментов и других белковых или связанных эффекторов, участвующих, например, в биохимическом каскаде, ведущем к свертыванию крови и выработке инсулина. Протеиназы удаляют сигнальные последовательности пептидов после их транспорта/секреции через мембраны, элиминируют N-концевые остатки метионина после трансляции.

Ежегодный мировой рынок ферментных препаратов оценивается 2,5–3 млрд долларов, из которых на долю протеиназы приходится около 60 % или 1,5–1,8 млрд долларов, включая щелочную

протеиназу для детергентов объемом 1 млрд долларов. Лидирующие позиции на рынке коммерческих ферментных препаратов принадлежат компаниям Novozymes [<http://www.novozymes.com/en>], Genencor International [<http://www.genencor.com>] и DSM [[http://DSM.com/en\\_US/dnp/anh\\_enzymes.htm](http://DSM.com/en_US/dnp/anh_enzymes.htm)] с долей, составляющей 41–44, 21 и 8 %, соответственно.

Протеолитические ферменты животных, растений и, особенно, микроорганизмов представляют собой крупнейший и наиболее важный сегмент рынка коммерческих ферментов, которые находят применение в пищевой, комбикормовой, кожевенной, фармацевтической, химической, промышленности, в растениеводстве [4–11].

Сегодня одним из приоритетных направлений использования протеолитических ферментов является медицина, где протеазы фибрино- и фибринолитического действия находят применение в качестве антикоагулянтов, тромболитиков, фибринолитиков и других лекарственных средств, влияющих на гемостаз [12–16].

Целью настоящей работы явился скрининг микробных протеиназ, отличающихся широкой субстратной специфичностью.

В работе использовали 60 бактериальных и грибных культур, представленных различными видами родов *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Paenibacillus*, *Aspergillus* из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и выделенных из природных источников.

Микроорганизмы выращивали на агаризованной среде, содержащей (в %):  $K_2HPO_4$  – 0,05;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,025; пептон ферментативный – 0,5; агар-агар – 1,5; один из специфических субстратов протеиназ – казеин, желатин, казеинат натрия, глобин, гемоглобин, сухое обезжиренное молоко – 1,0 или фибриноген – 0,5. Величину активной кислотности агаризованной среды устанавливали соответствующей рН 6,5–6,8. Длительность выращивания грибов составляла 6 сут при 24–26 °С, бактерий – 3 сут при 28–30 °С.

По окончании культивирования содержимое чашек обрабатывали окрашивающей смесью, состоящей из бриллиантового голубого G-250 (0,08 %) и хлорной кислоты (3,5 %). Протеолитическую активность микроорганизмов оценивали по их энзиматическому индексу – отношению диаметра зоны просветления специфического субстрата к диаметру колонии [17, 18].

Результаты исследований представлены средним арифметическим значением опытов, выполненных в трехкратной повторности.

Изучение способности исследуемых микробных культур гидролизовать глобулярные белки позволило выявить 27 культур, проявляющих казеинолитическую активность. Из них высоким уровнем деполимеризации казеина характеризовались 11 культур, представленных грибами рода *Aspergillus* (2), бактериями родов *Bacillus* (8) и *Paenibacillus* (1).

Результаты исследования субстратной специфичности протеиназ микробных культур с максимальным казеинолитическим индексом, составляющим 1,4–5,0, приведены в таблице.

Таблица – Протеолитическая активность микроорганизмов на агаризованных средах с различными белковыми субстратами

Микроорганизм	Энзиматический индекс						
	фибриноген	казеин	казеинат натрия	желатин	глобин	гемоглобин	молоко
<i>Bacillus</i> sp. 1182	3,0	4,7	3,1	3,8	1,1	10,0	3,1
<i>Bacillus</i> sp. 112	5,0	4,4	5,0	4,0	3,8	7,5	5,5
<i>Bacillus</i> sp. 199	5,0	4,2	2,4	6,0	1,1	8,5	3,9
<i>Bacillus</i> sp. 1114 D	1,2	3,6	5,0	4,0	2,1	6,3	7,5
<i>Bacillus</i> sp. 1211	1,1	5,0	3,2	2,0	1,1	3,0	3,4
<i>Bacillus</i> sp. 1138	1,7	3,8	3,0	1,8	1,3	1,6	3,2
<i>Paenibacillus</i> sp. 1369	2,2	2,0	2,0	2,5	1,8	1,4	2,2
<i>Aspergillus</i> sp. 1764	0	1,4	0	0	0	0	1,1
<i>Aspergillus</i> sp. 1	2,0	1,8	1,2	1,7	1,4	4,0	1,2

Как видно, у 8 из 9 исследованных штаммов обнаружена также способность гидролизовать фибриноген (индекс 1,1–5,0), казеинат натрия (1,2–5,0), желатин (1,7–6,0), глобин (1,1–3,8), гемоглобин (1,4–10,0), казеин молока (1,1–7,5). При этом наибольшим энзиматическим индексом (5,0)

по отношению к фибриногену характеризуются 2 изолята бактерий, предварительно отнесенных к роду *Bacillus*. Среди грибов фибринолитическая активность обнаружена только у штамма *Aspergillus* sp. 1.

Среди протеиназ, специфичных к фибриллярным белкам, наиболее известными являются стрептокиназа *Streptococcus hemolyticus* и стафилокиназа *Staphylococcus aureus*, а также фибринолитические ферменты бактерий рода *Bacillus*, субтилизины различных штаммов *B. subtilis*, наттокиназа *B. natto*, субтилизин DFE и субтилизин DJ-4 *B. amyloliquefaciens*. Протеиназы указанного действия синтезируют также бактерии рода *Streptomyces* (*S. megasporus* SD5, *S. spheroids* M8-2, *Streptomyces* sp. Y405), грибы *Aspergillus ochraceus* 513 [19], *A. terreus* 2, *A. flavipes* A17, *A. fumigatus* D1, *A. sydowii* 1 [20], *Fusarium oxysporum* [21], *Penicillium chrysogenum* H9 [22], *Rhizopus chinensis* 12 [23], *Cochliobolus lunatus*, *Pleurotus ostreatus* и другие. Хотя фибринолитические ферменты обнаружены у микроорганизмов различных таксономических групп, для их промышленного производства используются преимущественно штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные из традиционных ферментированных продуктов питания. Поэтому поиск и изучение фибринолитических ферментов, продуцируемых другими группами микроорганизмов, все еще продолжается. Особое внимание при этом уделяется исследованию субстратной специфичности ферментов и их тромболитических эффектов *in vivo*, а также совершенствованию тромболитических средств в части повышения их эффективности и специфичности к фибрину.

Таким образом, среди 60 исследованных микробных культур нами отобраны штаммы *Bacillus* sp. 112 и *Aspergillus* sp. 1 в качестве модельных объектов для изучения продукции, локализации и свойств протеиназ фибрино- и фибринолитического действия.

#### Список использованных источников

1. A systematic reconsideration on proteases / P. Gurumallesh [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 128. – P. 254–267, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081.
2. Ward, O.P. In Comprehensive Biotechnology / O.P. Ward // Univ. Waterloo, Canada; Industrial Biotechnol. Commod. Product. Proteases. – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 571–582. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1.
3. Сорокин, А.В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3–76.
4. Harrison, R.L. Proteases as insecticidal agents / R.L. Harrison, B.C. Bonning // Toxins (Basel). – 2010. – Vol. 2, № 5. – P. 935–953, doi: 10.3390/toxins2050935.
5. Niyonzima, F.N. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. / F.N. Niyonzima, S. More // Prep. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 45, № 3. – P. 233–258, doi: 10.1080/10826068.2014.907183.
6. Banerjee, G. Impact of microbial proteases on biotechnological industries / G. Banerjee, A.K. Ray // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. – 2017. – Vol. 33, № 2. – P. 119–143, doi: 10.1080/02648725.2017.1408256.
7. Dos Santos Aguilar, J.G. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. / J.G. Dos Santos Aguilar, H.H. Sato // Food Res. Int. – 2018. – Vol. 103. – P. 253–262, doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.044.
8. Bond, J.S. Proteases: History, discovery, and roles in health and disease / J.S. Bond // J. Biol. Chem. – 2019. – Vol. 294, № 5. – P. 1643–1651, doi:10.1074/jbc.TM118.004156.
9. Kumar, S.S. Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy / S.S. Kumar, A. Sabu // Adv. Exp. Med. Biol. – 2019. – Vol. 1148. – P. 345–381, doi: 10.1007/978-981-13-7709-9\_15.
10. Barzkar, N. Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications / N. Barzkar // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 161. – P. 1216–1229, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.072.
11. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors. A review. / M. A. Hassan [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 1, № 154. – P. 567–583, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.116.
12. Peng, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* / Y. Peng, X. Yang, Y. Zhang // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 69, № 2. – P. 126–132, doi: 10.1007/s00253-005-0159-7.
13. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз / Ю.В. Данилова [и др.] // Клет. Трансплантол. Ткан. Инженер. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 49–51.

14. Kotb, E. Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity / E. Kotb // Springer Briefs Microbiol, 2012. – P. 1–74, doi: 10.1007/978-3-642-24980-8\_1.
15. Fibrinolytic Actinokinase – A Short Review / D. Dhamodharan [et al.] // Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem. – 2015. – Vol. 13, № 2. – P. 78–81, doi: 10.2174/1871525713666150911113128.
16. Cai, D. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect / D. Cai, C. Zhu, S. Chen // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 33, № 5. – P. 84. doi: 10.1007/s11274-017-2253-2.
17. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов микромицетов *Aspergillus ochraceus* L-1 и *Aspergillus ustus* 1 / А.А. Осмаловский [и др.] // Весн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2016. – № 1. – С. 71–75.
18. Секреция микромицетами внеклеточных протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам / Е.А. Попова [и др.] // Весн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 241–245.
19. Batomunkueva, B.P. Isolation, purification, and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities / B.P. Batomunkueva, N.S. Egorov // Mikrobiologiya. – 2001. – Vol. 70, № 5. – P. 602–606, doi: 10.1023/A:1012343718772.20.
20. Combined microbiological approach to screening of producers of proteases with hemostasis system proteins activity among micromycetes / А.А. Осмаловский [et al.] // Biotechnol. Reports. – 2018. – Vol. 19. – P. 1–3, doi: 10.1016/j.btre.2018.e00265.
21. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum* / S. Tao [et al.] // Proc. Biochem. – 1998. – Vol. 33, № 4. – P. 419–422, doi: 10.1016/S0032-9592(97)00096-4.
22. EI-Aassar, S.A. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 / S.A. EI-Aassar // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1990. – Vol. 33 – P. 26–30, doi: 10.1007/BF00170564.
23. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097 / B. Wu [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 36. – P. 451–459, doi: 10.1007/s10295-008-0516-5.

УДК 611.612.06

**АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДОВ  
*LACTOBACILLUS* И *BIFIDOBACTERIUM* К НЕКОТОРЫМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ  
УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА**

**О.В. Локутова, Е.Р. Грицкевич**

*МГЭИ имени А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь, o.lokutova@mail.ru*

В последние десятилетия внимание врачей и специалистов различного профиля привлекает применение препаратов-пробиотиков, оказывающих терапевтическое действие путем регуляции состава микрофлоры кишечника. Одним из факторов возросшего интереса является необходимость поиска новых методов терапии, в том числе из-за снижения эффективности антибиотиков и химиопрепаратов, а также увеличение частоты осложнений и побочных реакций при их использовании.

К пробиотикам относят живые микроорганизмы, представители в основном облигатной микрофлоры человека, которые при попадании в желудочно-кишечный тракт человека в достаточном количестве сохраняют свою активность, жизнеспособность и оказывают положительное влияние на его здоровье. Большинство пробиотиков-бактерий относится к двум родам: лактобактерии (лат. *Lactobacillus*) и бифидобактерии (лат. *Bifidobacterium*), но существует много других видов бактерий-пробиотиков. Каждый род бактерий содержит значительное число видов, у каждого вида имеются различные штаммы.

Для пробиотиков важным свойством используемого микроорганизма является наличие ярко выраженной антагонистической активности. Данное свойство позволяет использовать пробиотики для усиления, коррекции, а, в некоторых случаях, и как альтернативу антибиотикотерапии. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий, в частности и лактобацилл с бифидобактериями, проявляется несколькими путями: конкуренцией за питательные вещества, конкуренцией за сайты адгезии и в продукции ингибирующих рот культуры-конкурента веществ.

*Bifidobacterium spp* обладают высокой антагонистической активностью по отношению ко многим патогенным микроорганизмам, препятствуя их проникновению в организм человека. Выделяя молочнокислую и уксусную кислоты, бифидобактерии способствуют усилению процессов пищеварения, участвуя в гидролизе белков, сбраживании сахара, расщеплении жиров.

*Lactobacillus spp* обладают широким спектром антагонистической активности, благодаря чему подавляется рост патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоры: в первую очередь протеев, сальмонелл, дизентерийной палочки. В процессе своей жизнедеятельности лактобациллы синтезируют молочную кислоту, перекись водорода, лизоцим и другие вещества, обладающие антибиотической активностью.

В ходе нашего исследования нами были самостоятельно выделены и идентифицированы молочнокислые бактерии *Bifidobacterium longum bifidum-1 или 791* из препарата «Бифидумбактерин», *Lactobacillus rhamnosus GG* из препарата «Нормобакт».

Для выявления антагонистической активности молочнокислых бактерий по отношению к патогенным и условно-патогенным тест-штаммам бактерий был использован метод агаровых блоков. Анализ динамики развития антагонистической активности проводили на 2-е и 3-е сутки.

В ходе нашего исследования нами была изучена антагонистическая активность пробиотических бактерий родов *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека, таким как: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli XL-1 Blue*, *Escherichia coli B*, *Escherichia coli ATCC 25922* (таблица 1, 2).

Таблица 1. – Антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма *Bifidobacterium longum bifidum-1 или 791*, выделенных из препарата «Бифидумбактерин», по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека на 1, 2 и 3 сутки совместного культивирования

Антагонистическая активность (зоны задержки роста, мм)						
Сутки	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli XL-1 Blue</i>	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	<i>Escherichia coli B</i>
1	2,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,3	1,3 ± 0,4	3,0 ± 0,1	0
2	3,3 ± 0,3	5,3 ± 0,2	4,3 ± 0,3	2,0 ± 0,6	4,1 ± 0,1	0
3	4,3 ± 0,3	12,5 ± 0,2	5,2 ± 0,5	3,1 ± 0,5	7,8 ± 0,2	0

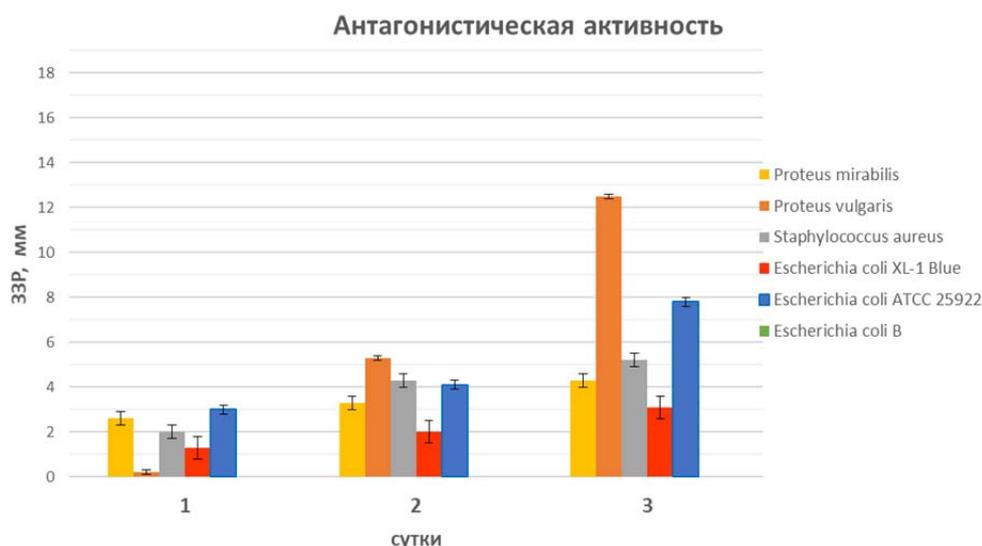
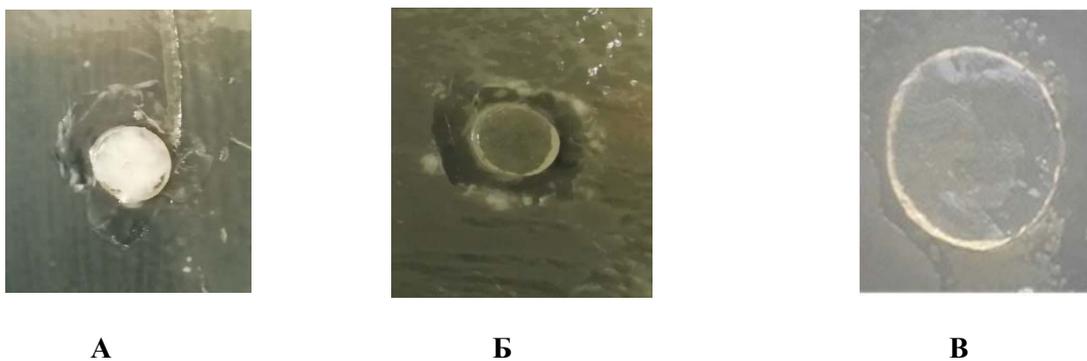


Рисунок 1. – Антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма *Bifidobacterium longum bifidum-1 или 791*, выделенных из препарата «Бифидумбактерин», по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека на 1, 2 и 3 сутки совместного культивирования

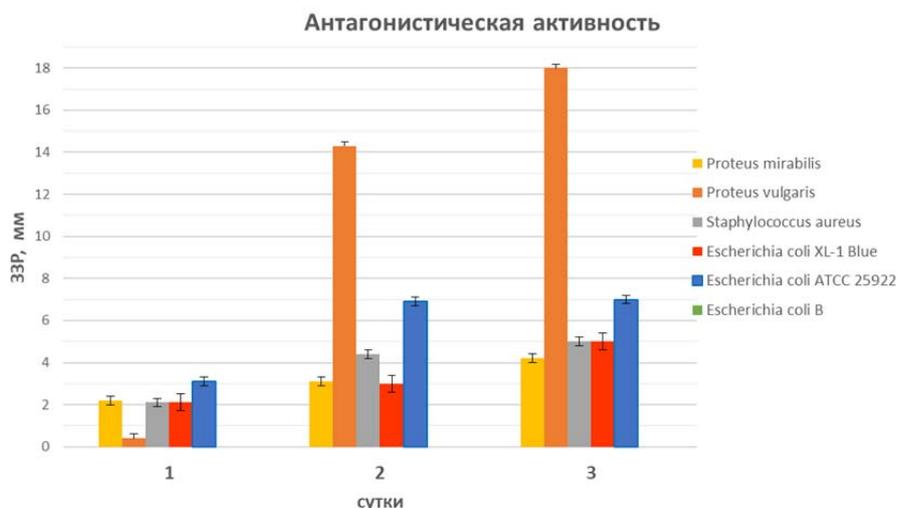


**Рисунок 2. - Антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма *Bifidobacterium longum bifidum-1* или 791, выделенных из препарата «Бифидумбактерин», по отношению к:**  
**А) *Proteus mirabilis* Б) *Proteus vulgaris* В) *Escherichia coli* ATCC 25922 на 3 сутки совместного культивирования**

Было показано (рисунок 1), что антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма бифидобактерий, выделенного из препарата «Бифидумбактерин сухой», постепенно возрастает при совместном культивировании с некоторыми представителями условно-патогенной микрофлоры на 3 сутки. Наибольшее угнетающее действие данный штамм проявляет по отношению к *Proteus vulgaris* (ЗЗР,  $12,5 \pm 0,2$  мм) и отсутствие данного действия наблюдается по отношению к *Escherichia coli* В.В таблице 2 представлены результаты антагонистической активности молочнокислых бактерий штамма лактобацилл (*Lactobacillus rhamnosus GG*), выделенного из препарата «Нормобакт Л». Антагонистическая активность данного штамма проявляется по отношению ко всем штаммам энтеробактерий, кроме *Escherichia coli* B. С течением времени она нарастает плавно, что видно на рисунке 3, однако по отношению к *Proteus vulgaris* наблюдается более сильное, скачкообразное угнетающее действие.

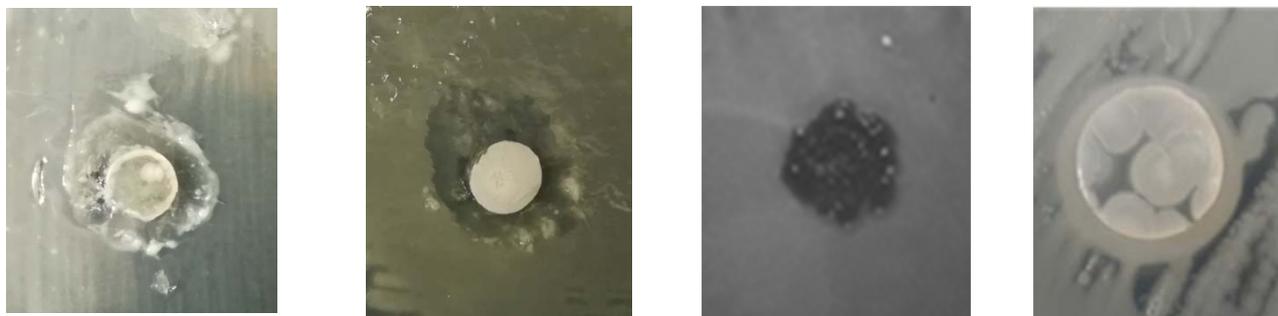
**Таблица 2. – Антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus rhamnosus GG*, выделенных из препарата «Нормобакт», по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека на 1, 2 и 3 сутки совместного культивирования**

Антагонистическая активность (зоны задержки роста, мм)						
Сутки	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli XL-1 Blue</i>	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	<i>Escherichia coli B</i>
1	$2,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,2$	0
2	$3,1 \pm 0,3$	$14,3 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,2$	0
3	$4,2 \pm 0,2$	$18,0 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,3$	0



**Рисунок 3. –Антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus rhamnosus GG*, выделенных из препарата «Нормобакт», по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека на 1, 2 и 3 сутки совместного культивирования**

На 2-е и 3-е сутки совместного культивирования антагонистическая активность *Lactobacillus spp.* по отношению к *Proteus vulgaris* была снижена, однако отмечалась увеличение зоны задержки роста последней (ЗЗР,  $14,3 \pm 0,2$  мм до  $18,0 \pm 0,3$  мм), что может говорить о стабильном бактерицидном действии данных молочнокислых бактерий на условно-патогенные бактерии. Было показано, что данные микроорганизмы проявляют антагонистическую активность в отношении условно - патогенных и патогенных микроорганизмов, но не сразу, так как с данными микроорганизмами происходит адаптация к среде.



**А** **Б** **В** **Г**  
**Рисунок 4.** –Антагонистическая активность молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus rhamnosus GG*, выделенных из препарата «Нормобакт», по отношению к: А) *Proteus mirabilis* Б) *Proteus vulgaris* В) *Staphylococcus aureus* Г) *Escherichia coli XL-1 Blue* на 3 сутки совместного культивирования

Таким образом, было показано, что *Bifidobacterium bifidum* выделенный из препарата «Бифидумбактерин сухой», *Lactobacillus rhamnosus GG ATM 53103* из препарата «Нормобакт L», проявили высокую антагонистическую активность по отношению к *Proteus vulgaris* (ЗЗР,  $12,5 \pm 0,2$  мм;  $18,0 \pm 0,3$  мм соответственно) на 3 сутки совместного культивирования. Минимальная антагонистическая активность штаммов *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus GG ATM 53103* (ЗЗР,  $0,2 \pm 0,1$ ;  $0,4 \pm 0,2$  мм соответственно). В то же время антагонистическая активность данных молочнокислых бактерий по отношению к *Escherichia coli B* отсутствовала. А также была отмечена их стабильная активность по отношению к *Escherichia coli XL-1 Blue* и *Escherichia coli ATCC 25922*, что может говорить о том, что данные бактерии рода *Lactobacillus* входящие в состав препарата «Нормобакт L», штамм *Lactobacillus rhamnosus GG ATC 53103* и бактерии рода *Bifidobacterium* входящие в состав препарата «Бифидумбактерин сухой» штамм *Bifidobacterium bifidum* наиболее эффективны по отношению к таким бактериям и могут использоваться при подавлении роста и развития условно-патогенной микрофлоры человека.

Антагонистическая активность наиболее ярко *in vitro* определяется на 3 сутки совместного инкубирования с условно-патогенной микрофлорой. Эти результаты можно учитывать при использовании данных видов бактерий для подавления роста и развития бактерий рода *Proteus*: *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* в *in vivo*.

На основе этих данных можно предположить, что употребление исследуемых пробиотиков, содержащих высокопродуктивные штаммы молочнокислых бактерий с высокой антагонистической активностью, будет способствовать восстановлению нормофлоры человека и защите организма от развития заболеваний ЖКТ, вызванных условно-патогенной микрофлорой.

Результаты работы могут быть использованы при разработке методических рекомендаций для изучения антагонистической активности пробиотических препаратов молочнокислых бактерий по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека.

#### Список использованных источников

1. Амерханова, А.М. Роль пробиотических микроорганизмов в современных технологиях профилактической и восстановительной медицины и возможности повышения эффективности препаратов на их основе / А. М. Амерханова [и др.]. // Новые лекарственные средства. –2007. – № 4. – С. 4-5.
2. Бондаренко, В.М. Анализ профилактического и лечебного действия пробиотических препаратов с позиций новых научных технологий / В.М. Бондаренко // Микробиолог. – 2015. – № 2. – С. 90-91.

3. Бухарин, О.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии / О.В. Бухарин [и др.]. // Клиническая микробиология антимикробной химиотерапии. –2010. – Том 12.– № 4.– С. 347-348.

УДК 546.26: 541.69

## ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ И АДсорбЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НАНОДИСПЕРСНЫХ АЛМАЗОВ

Д.А. Макаревич<sup>1</sup>, Т.В. Рябцева<sup>1</sup>, Н.Н. Ковганко<sup>1</sup>, Р.Г. Штемплук<sup>2</sup>, Т.Н. Принькова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>НП ЗАО «Синта», Минск, Беларусь

demkarevich@yandex.ru

Наноалмазы (НА), получаемые при взрыве в замкнутом объеме конденсированных взрывчатых веществ с отрицательным кислородным балансом [1,2], представляют собой особый тип алмазных материалов. Это типичный наноматериал со средним размером зерен ~ 4 nm, обладающих преимущественно сферической формой. При среднем диаметре частицы НА 4.2 nm доля поверхностных атомов составляет ~ 15% [3,4]. За счет кристаллической решетки типа алмаза данные наночастицы обладают уникальными физико-химическими свойствами по сравнению с другими углеродными материалами. Для биомедицинского использования наноалмазов важными критериями являются: аномально высокая адсорбционная способность, большая удельная поверхность, обилие свободных электронов на поверхности (множественный радикал-донор), нанометрические размеры, большое количество кислородсодержащих функциональных групп на поверхности кристаллов, химическая инертность зерна, гидрофильный характер поверхности [5,6]. Исследования, проведенные в ИСМ НАН Украины по изучению адсорбционных свойств микропорошков синтетических алмазов различных зернистостей и по модифицированию их поверхности, показали, что алмазы являются селективными адсорбентами компонентов биологических сред. Так, например, модифицированные кислородсодержащими группами алмазы (гидрофилизованные) наиболее полно очищают биологические среды (кровь) от белка, а модифицированные водородом (гидрофобизованные) наиболее активно адсорбируют ионы тяжелых металлов [7].

Существующие углеродные гемосорбенты (СКТ-6А, БАУ, ВНИИТУ-1, Гемос-Бел) имеют ряд недостатков: низкое качество углеродных гранул с высоким содержанием минеральных примесей (зола) и шероховатым рельефом поверхности, способных травмировать оболочки элементов крови и удерживать их на своей поверхности, а также недостаточная адсорбционная активность по отношению к азотсодержащим токсическим продуктам обмена белков и нуклеиновых кислот, накапливающихся в организме при различных заболеваниях, в частности, билирубин, креатинину и мочевины. Данные недостатки ограничивают применение сорбентов в эфферентной терапии. Таким образом, разработка эффективных и безопасных угольных сорбентов является актуальной задачей современной биохимии [8].

Цель исследования – изучить гемосовместимость и адсорбционные свойства иммобилизованных на полимерном носителе нанодисперсных алмазов.

Материалы и методы.

В работе использовали четыре образца наноалмазов детонационного синтеза: УДА-ЧОШ (1), УДА-ГО-СП (2), УДА-СП М1 (3); УДА-СП+М2 (4) (табл.1). Гемосовместимость иммобилизованных наноалмазов оценивали после инкубации с разведенной в 5 раз цельной кровью здоровых добровольцев. Адсорбционную способность определяли по адсорбции красителя метиленовый синий. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Statistica 12. Значения представляли в виде Me (25–75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей.

Учитывая небольшой объем выборки, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения трех групп независимых данных был использован метод рангового анализа вариаций Краскела-Уоллиса. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$ .

Таблица 1. – Характеристика наноалмазов детонационного синтеза, использованных для иммобилизации

	УДА-ЧОШ-СП	УДА-ГО-СП	УДА-СП М1	УДА-СП+ М2
Метод получения	Селективное окисление АШ-В	Химическая очистка АШ-В	Высокотемпературная обработка наноалмаза в газовой среде	Комплексное жидкофазное и газофазное модифицирование
Внешний вид	Черный порошок	Серый порошок	Серый порошок	Серый порошок
Форма частиц	Частицы неправильной округлой формы	Сферические частицы	Сферические частицы	Сферические частицы
Размер единичного кристалла	10 нм	30-900 нм	4-6 нм	4-6 нм
Окисляемые формы углерода, %	38,4	1,2	0,8	0,8
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	399	295	255	255
Объем пор, см <sup>3</sup> /г	0,993	0,840	0,810	0,810
Функциональные поверхностные группы	CO <sub>2</sub> H, CO <sub>2</sub> R, CH <sub>x</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>x</sub>	CO <sub>2</sub> H, CO <sub>2</sub> R, CH <sub>x</sub> , C-N, C=N, C-O-O, OH, CO	CO <sub>2</sub> H, CO <sub>2</sub> R, CH <sub>x</sub> , N-H	CO <sub>2</sub> H, CO <sub>2</sub> R, CH <sub>x</sub> , N-H
Электрокинетический потенциал водной суспензии	-83,88 мВ (рН=10)	-59,44 мВ (рН=10)	+66,06 мВ (рН=3)	+66,06 мВ (рН=3)

**Результаты.** В результате химического синтеза из 10 мл раствора для полимеризации и 50 мг углеродных наночастиц было синтезировано по 30 г каждого образца для изучения адсорбционной активности иммобилизованных наночастиц углерода. Качество полимеризации и иммобилизации оценивали с помощью визуального и спектрофотометрического анализа растворов после промывки полученных образцов (табл. 2).

Анализ показал, что при промывке происходит установление рН раствора в диапазоне нейтральных значений. Снижение оптической плотности промывочных растворов при 230 нм до нулевых значений свидетельствует об удалении из объема геля всех практически всего непрореагировавшего акриламида и других соединений. Визуальный анализ показал, что промывочные растворы не содержат черных или серых частиц исходного сырья для иммобилизации. Первый промывочный раствор после иммобилизации частиц типа УДА-ЧОШ-СП оказался желтого цвета, что свидетельствует о возможном содержании примесей железа в образце.

Исследование влияния контакта иммобилизованных углеродных наночастиц на целостность эритроцитов показало, что после длительного контакта полиакриламидного геля с наночастицами наблюдается гемолиз, не превышающий 10 %. Минимальные значения гемолиза наблюдали после контакта крови с иммобилизованными частицами типа УДА-СП+(М2). Максимальный гемолиз – после контакта с частицами УДА-ЧОШ-СП (рис.1). Полученные результаты свидетельствуют о влиянии метода получения углеродных наночастиц и степени очистки на их гемосовместимость.

Таблица 2. – Физико-химические показатели геля с иммобилизованными углеродными наночастицами

Наименование показателя	УДА-ЧОШ-СП	УДА-ГО-СП	УДА-СП М1	УДА-СП+ М2
Характеристика исходного сырья для лигандизации,	Тонкодисперсный порошок черного цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета	Тонкодисперсный порошок серого цвета
Внешний вид иммобилизованных частиц наноглериода	Тонкие нити (диаметром 1-2 мм) полимера (ПААГ) с включениями черного цвета	Тонкие нити (диаметром 1-2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета	Тонкие нити (диаметром 1-2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета	Тонкие нити (диаметром 1-2 мм) полимера (ПААГ) с включениями серого цвета
pH раствора при хранении геля с НА	6,61	6,45	6,51	6,55
1-ая промывка	9,19 [9,10-9,30]	9,57 [9,40-9,80]	10,20 [10,0-10,35]	8,79 [8,50-8,90]
2-ая промывка	8,58 [8,18-8,60]	9,27 [9,10-9,75]	9,76 [9,50-10,10]	8,30 [8,15-8,68]
3-я промывка	7,93 [7,50-8,15]	8,10 [8,05-8,48]	8,20 [8,05-8,30]	7,40 [7,15-7,70]
4-я промывка	7,95 [7,30-8,05]	7,67 [7,54-7,86]	7,40 [7,15-7,65]	7,10 [6,80-7,20]
5-я промывка	7,25 [7,15-7,64]	6,90 [6,40-7,10]	6,70 [6,50-6,80]	6,60 [6,50-6,65]
Спектральная характеристика раствора после промывки, $\lambda=230\text{nm}$				
1-ая промывка	3,53 [3,20-3,80]	1,74 [1,50-1,80]	3,34 [3,30-3,60]	3,31 [3,28-3,40]
2-ая промывка	2,17 [2,10-2,60]	1,13 [1,10-1,18]	2,01 [1,98-2,15]	1,93 [1,88-1,96]
3-я промывка	0,28 [0,26-0,33]	0,16 [0,10-0,22]	0,29 [0,20-0,36]	0,29 [0,15-0,32]
4-я промывка	0,10 [0,06-0,15]	0,06 [0,03-0,10]	0,09 [0,07-0,11]	0,08 [0,05-0,12]
5-я промывка	0,01 [0,01-0,02]	0,01 [0,01-0,05]	0,01 [0,01-0,02]	0,03 [0,01-0,06]

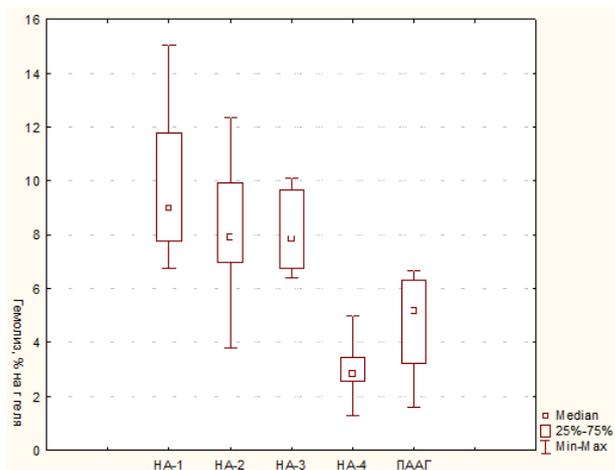


Рисунок 1 – Оценка гемолиза после длительного (60 мин.) контакта крови с иммобилизованными на полиакриламидном геле углеродными наночастицами

Тем не менее, иммобилизованные углеродные наночастицы можно считать гемосовместимыми, так как кратковременный контакт (менее 5 минут) крови с иммобилизованными наноалмазами, который происходит при перфузии крови через ёмкость с гелем не вызывал значимого гемолиза (табл.3).

Таблица 3. – Процент гемолиза крови после кратковременного контакта с полиакриламидным гелем, лигандизованным наноалмазами

Образец	Процент гемолиза, %
кровь + дист. вода	100
УДА-ЧОШ-СП-ПААГ	0,38 (0,32;0,43)
УДА-ГО-СП-ПААГ	0,18 (0,12;0,25)
УДА-СП - ПААГ	0,14 (0,09;0,19)
УДА-СП+(М2)- ПААГ	0,30 (0,26;0,37)
ПААГ	0,48 (0,42;0,53)

Изучение неспецифической адсорбции метиленового синего наноалмазами в растворе показало, что максимально эффективными являются наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП (НА-1). На 1 мг наноалмазов сорбция МС составляет 25,63 [23,53-28,49] мг (рис.2). Адсорбция остальных образцов по сравнению с НА-1 невелика и примерно одинаковая: для НА-2 – 6,25[4,95-7,10] мг, для НА-3 – 8,72 [7,93-9,80] мг, для НА-4 – 8,41 [7,84-9,23] мг. Полученная разница в адсорбции объясняется тем, что наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП обладают удельной поверхностью 399 м<sup>2</sup>/г, которая больше, чем у других образцов наноалмазов.

Исследование адсорбционных свойств иммобилизованных наноалмазов подтвердило тенденцию: максимальной адсорбционной активностью обладают наноалмазы типа УДА-ЧОШ-СП (рис.2).

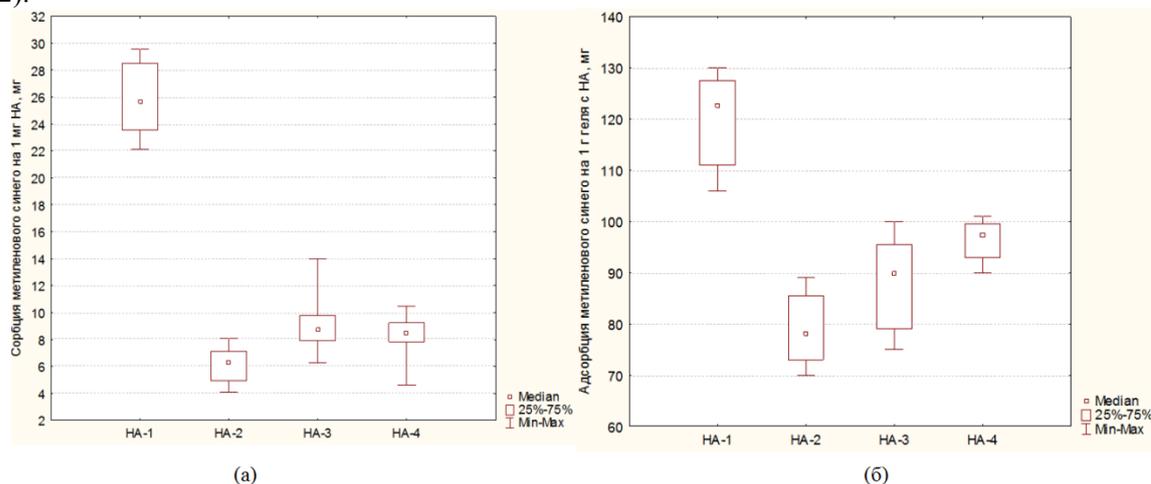


Рисунок 2. – Адсорбция метиленового синего: наноалмазами (50мг) различной модификации (а), иммобилизованными наноалмазами (б)

Значение адсорбции иммобилизованными наноалмазами по сравнению со свободными увеличивается в несколько раз. Это объясняется собственной неспецифической адсорбционной способностью полиакриламидного геля по отношению к метиленовому синему.

Выводы: Проведенная научно-исследовательская работа показала, что исследованные образцы наноалмазов не вызывают при кратковременном воздействии гемолиз и обладают высокими сорбционными свойствами. К перспективным образцам для создания сорбентов можно отнести образцы наноалмазов УДА-ГО-СП и УДА-СП.

#### Список использованных источников

1. Даниленко, В.В. Из истории открытия синтеза наноалмазов // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 46, № 4. – С. 581–584.
2. Osawa, E. “Superaromacity” / E. Osawa, Kagaku (Kyoto) // Chem. Abs. 1970 – Vol. 25. – P. 854–863.
3. Kiffer, A. D. Confidential memorandum: synthesis of diamond from carbon monoxide. / A.D. Kiffer, W.G. Eversole // Tonawanda laboratories, Linde air products Co. – 1956.
4. Angus, J. C. Diamond synthesis at low pressure. / J. Angus // Internal 3M Report. 1960.

5. Angus, J. C. Growth of diamond seed crystals by vapor deposition / J.C. Angus, H.A. Will, W.S. Stanko // Appl. Phys. 1968 –Vol. 39. – P. 2915–2922.
6. Matsumoto, S. Vapor deposition of diamond particles from methane / S. Matsumoto [et al.] // Jpn. J. Appl. Phys. 1982. – Vol. 21. – P.183–185.
7. Bogatyreva, G. P. Diamond — an adsorbent of a new type / G.P. Bogatyreva, M.A. Marinich, V.L. Gvyazdovskaya // Diamond relat. mater. 2000. – 9, N. 12. – P. 2002—2005.
8. Gharbi, N. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. / N. Charbi [et al.] // Nano Letters. 2005. – Vol. 5, N.12. – P. – 2578–2585.

УДК 539.6+577.3

## МОДЕЛИРОВАНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ОЛИГОПЕПТИДОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ КОМПОНЕНТ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА C1q

Д.А. Макаревич, С.Д. Бруякин

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск  
demkarevich@yandex.ru

Результаты исследований последних лет указывают на проблему чрезмерной активации системы комплемента по классическому пути, которая приводит к запуску различных патологических процессов. Так активация по классическому пути усугубляет или инициирует: реакцию отторжения трансплантата, после пересадок органов и тканей; развитие поражений органов и систем при миастении Гравис и других аутоиммунных заболеваниях; потенцирует патологические механизмы холодовой аллергии [1-5]. Поэтому существует необходимость подавлять избыточную активацию системы комплемента по классическому пути для предотвращения развития этих патологических процессов. Для решения проблемы ингибирования существуют технологии получения моноклональных антител, предназначенных для ингибирования избыточной активации системы комплемента по классическому пути Sutilimab. Этот препарат представляет собой химерное человеческое антитело (Bioverativ, Sanofi). С 2018 Сутилимаб проходит III фазу клинических испытаний [6]. Однако для препаратов на основе моноклональных антител характерно наличие ряда недостатков: высокая стоимость, возможность развития иммунного ответа на препарат с последующим уменьшением его эффективности, индивидуальная непереносимость и другие. Поэтому перспективным направлением является поиск ингибиторов стартовой молекулы активации системы комплемента по классическому пути C1q. Олигопептидные ингибиторы – низкомолекулярные лиганды, лишённые перечисленных выше недостатков, характеризующиеся сходной связывающей способностью. Тримерный C1q обозначается как gC1q и может связываться с Fc-участками иммуноглобулинов G и M. Такое распознавание приводит к активации системы комплемента по классическому пути. Наиболее изученными лигандами C1q являются комплексы с IgG и IgM. Сродство между C1q и одной молекулой IgG низкое, однако на поверхности клеток мишеней IgG могут олигомеризоваться, обеспечивая мультивалентное связывание C1q и запуск активации системы комплемента по классическому пути [7]. Поэтому для моделирования олигопептидов, ингибиторов молекулы C1q нами был выбран комплекс 6Z6V. В этом комплексе один мономер C1q из gC1q связывается с несколькими участками антитела C1qNb75. Такая характеристика комплекса позволяет предложить для молекулярного докинга небольшое количество структур и оценить степень связывания компонента C1q *in silico*.

Цель работы – молекулярный докинг олигопептидов, связывающих компонент системы комплемента C1q.

Материалы и методы. Анализ структуры 6Z6V (PDB: 6Z6V, 2,19 Å) и активного центра связывания ламового антитела C1qNb75 и молекулы C1q проводили с использованием вебсервиса Protein Interactions Calculator (PIC). В программе UCSF Chimera 1.15rc были сконструированы олигопептиды, представляющие собой участки антитела MEDI7814. Докинг перспективных олигопептидов с молекулой C1q проводили в UCSF Chimera 1.15rc с использованием AutoDock Vina 1.1.2.

**Результаты.** Изучение центра связывания комплекса c1q и ламового антитела (6Z6V) показало, что в непосредственном контакте со стороны ламового антитела принимают участие 4 участка представленных в таблице 1.

Ламовое антитело C1qNb75	Длина участка связывания с C1q	Аминокислотные остатки
1 участок	8	52-60
2 участок	4	102-105
3 участок	3	32-34
4 участок	5	72-76

С помощью сервиса PIC (Protein Interactions Calculator, Molecular Biophysics Unit, Indian Institute of Science, Bangalore) установлено наличие 2 гидрофобных взаимодействий менее 5 ангстрем (Å) с Ala 54 и Val, Pro цепи В C1q. Водородная связь между 55 Gly и Asp цепи В C1q с длиной связи 2,86 Å. Водородные связи (2,77 Å и 2,67 Å) между 103,104 Pro и Gly соответствуют Thr и His C1q. Взаимные водородные взаимодействия с длинами связи до 5 Å отмечены также для 59 His и 102 Thr C1q, 75 Asp и 129 Arg C1q, 32 Asn с 121 Asn C1q и 53 Thr с 116 Asp C1q. Установлено 3 ионных взаимодействия с длиной связи до 6 Å. Между 59 His и 116 Asp C1q. 2 взаимодействия с 73 и 75 Asp с 129 Arg C1q. На основе выявленных участков связывания антитела C1qNb75 предложены олигопептиды, предположительно являющиеся лигандами для связывания компонента системы комплемента C1q. *In silico* проведен скрининг связывания компонента C1q 21 олигопептидами. Для каждого олигопептида было получено 10 возможных вариантов связывания и в программе Chimera 1.15rc, рассчитаны значения RMSD l.b и RMSD u.b. для каждой позиции. Для дальнейших исследований *in vitro* были отобраны олигопептиды со средней энергией связывания  $\Delta G$  ниже -5,5 kcal / mol. Выявлены наилучшие олигопептиды, участки антитела C1qNb75: PGW (Pro-Gly-Trp) (103-105 аминокислотные остатки антитела C1qNb75) с энергией связывания компонента C1q - 5,67 (5,4; 5,81); NYA (His-Tyr-Ala) (59-61 аминокислотные остатки антитела C1qNb75) с энергией - 5,52 (5,39; 5,73) kcal / mol.

Выводы. Скрининг и молекулярный докинг *in silico* олигопептидов, составляющих активный центр связывания C1q и антитела C1qNb75, выявили 2 перспективные для дальнейших экспериментов по ингибированию активности C1q *in vitro* олигопептиды: PGW (Pro-Gly-Trp) и NYA (His-Tyr-Ala).

#### Список использованных источников

1. The production and secretion of complement component C1q by human mast cells / V. Schaarenburg [et al.] // *Molecular immunology*. 2016. – Vol. 78. – P. 164–170.
2. C1q: A fresh look upon an old molecule // N. M. Thielens [et al.] // *Molecular immunology*. 2017. – Vol. 89. – P. 73–83.
3. Howard, J. F. Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction / J.F. Howard // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017. – Vol. 1412, N.1. – P. 113–128.
4. Berentsen, S. Cold agglutinin disease / S. Berentsen // *Hematology*. 2016. – Vol.1. – P. 226–231.
5. Functional and structural characterization of a potent C1q inhibitor targeting the classical pathway of the complement system / N. S. Laursen [et al.] // *Frontiers in Immunology*. 2020. – Vol.11. – P.1-15.
6. Inhibition of complement C1s improves severe hemolytic anemia in cold agglutinin disease: a first-in-human trial / U. Jager [et al.] // *Blood*. 2019. – Vol.133. – P. 893–901.
7. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface / C.A. Diebold [et al.] // *Science*. 2014. – Vol. 343, N. 6176. – P.1260–1263.

УДК 576.8

### АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

**С.В. Мальцева, А.С. Якубович, Е.Р. Грицкевич**

*МГЭИ имени А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь*

*sveta.malceva28@mail.ru, anya.yakubovich.00@inbox.ru, gritskevitch@mail.ru*

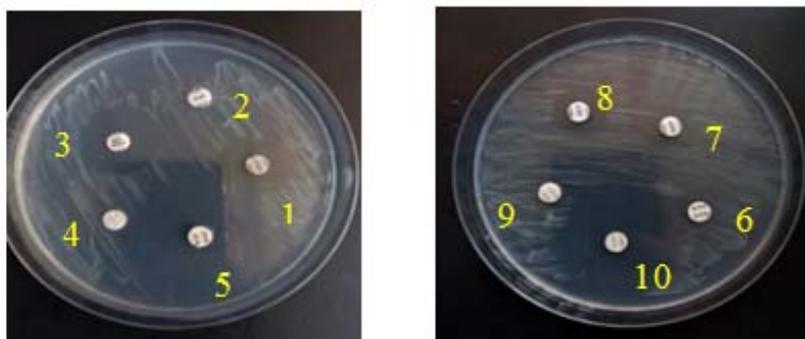
В последние годы наблюдается значительное увеличение интереса исследователей к спорообразующим бактериям рода *Bacillus*, которые широко используются в биотехнологии для получения генно-инженерного интерферона, инсулина,  $\alpha$ -амилазы, липазы и ряда протективных антигенов патогенных бактерий. Апатогенные спорообразующие бактерии рода *Bacillus subtilis*, являю-

щиеся представителями транзитарной микрофлоры кишечника, способны синтезировать десятки разных антибиотикоподобных веществ, что до настоящего времени привлекает к ним пристальное внимание исследователей, занимающихся разработкой бактериальных пробиотических препаратов, а также изучением функционирования почвенных микробных комплексов.

Самую большую группу микроорганизмов составляют аэробные спорообразующие бактерии. Множество микробиологов заняты изучением рода бактерий *Bacillus*, о которых написано большое количество статей, научных трудов и книг. *B. subtilis* – является одним из самых изученных микроорганизмов среди рода *Bacillus*. Польза данной бактерии подтверждена использованием её в различных сферах: медицине, животноводстве, растениеводстве и др., поскольку данный штамм обладает чрезвычайно высокой и разнообразной биохимической активностью. Также, одной из изученных спорообразующих бактерий является *Bacillus clausii* (*B. clausii*). В исследованиях на животных установлен факт перехода в течение 2 ч после введения препарата 90% спор *B. clausii* в вегетативные формы, что сопровождается интенсивной продукцией таких активных биологических веществ, как протеолитические ферменты, субстанции с антибактериальной активностью, лизоцим, аминокислоты, витамины.

В ходе исследования нами были самостоятельно выделены и идентифицированы некоторые спорообразующие бактерии из разных пробиотических препаратов (Ветом 1.1, Энтерожермина). Анализ чувствительности к антибиотикам бактерий рода *Bacillus* проводился с использованием диско-диффузионного метода, а анализ антагонистической активности спорообразующих штаммов данных микроорганизмов осуществлялась методом агаровых блоков.

В ходе исследования была изучена чувствительность *B. subtilis*, выделенных из препарата «Ветом 1.1», *B. clausii*, выделенных из препарата «Энтерожермина» к антибиотическим препаратам широкого спектра действия. Высокий уровень резистентности к широкому спектру антибиотических препаратов показали бактерии *B. clausii* (рисунок 1).



**Рисунок 1. – Анализ чувствительности штамма *B. clausii* к антибиотикам широкого спектра действия (1. РИФ - рифампицин, 2. ЭРН – эритромицин, 3. ГЕН – гентамицин, 4. ЦТК – цефотаксим, 5. ДОК – доксициклин, 6. КТМ - кларитромицин, 7. АКЦ – амоксициллин, 8. СТР – стрептомицин, 9. ЦФТ – цефалотин, 10. ЦИП – ципрофлоксацин)**

Следует отметить, что бактерии *B. subtilis*, выделенные из препарата «Ветом 1.1», показали наибольшую чувствительность к некоторым представителям групп тетрациклинов (ДОК  $18 \pm 0,1$ ) и макролидов (КТМ  $18 \pm 0,2$ ) (рисунок 2).



**Рисунок 2. – Анализ чувствительности штамма *B. subtilis* к антибиотикам (1. РИФ - рифампицин, 2. СТР – стрептомицин, 3. АКЦ – амоксициллин, 4. ЦИП – ципрофлоксацин, 5. ЦФТ – цефалотин, 6. КТМ - кларитромицин, 7. ДОК – доксициклин, 8. ЭРН – эритромицин, 9. ГЕН – гентамицин, 10. ЦТК – цефотаксим)**

Было показано, что штамм *B. subtilis*, выделенный из препарата «Ветом 1.1», проявляет наибольшую чувствительность по отношению к кларитромицину ( $18 \pm 0,2$ ), доксициклину ( $18 \pm 0,1$ ) и стрептомицину ( $17 \pm 0,1$ ), в меньшей степени к остальным антибиотикам.

*B. clausii*, выделенный из препарата «Энтерожермина» обладает высокой чувствительностью к доксициклину ( $19 \pm 0,2$ ) и ципрофлоксацину ( $14 \pm 0,2$ ), но в меньшей степени к гентамицину ( $8 \pm 0,4$ ), рифампицину ( $5 \pm 0,3$ ) и стрептомицину ( $4 \pm 0,3$ ). Также можно заметить отсутствие чувствительности к амоксициллину у всех представленных штаммов спорообразующих бактерий.

Наиболее высокий уровень устойчивости к антибиотикам широкого спектра действия показал штамм *B. clausii*, выделенный из препарата «Энтерожермина». В свою очередь, штамм *B. subtilis*, выделенный из препарата «Ветом 1.1», проявил чувствительность к широкому спектру антибиотиков на 20% выше, чем *B. clausii*, выделенный из препарата «Энтерожермина».

Также нами была изучена антагонистическая активность некоторых **бактерий рода *Bacillus* к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека**. Результаты показали низкую (до 10 мм) антагонистическую активность бактерий *B. subtilis*, выделенных из препарата «Ветом 1.1», в отношении некоторых условно-патогенных микроорганизмов.

Таблица 1. – Антагонистическая активность бактерий *B. subtilis*, выделенных из препарата «Ветом 1.1», в отношении условно-патогенных микроорганизмов

Штамм	Антагонистическая активность (зоны задержки роста, мм)		
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. subtilis</i>	$2 \pm 0,3$	–	$3 \pm 0,3$

Низкий уровень антагонизма *B. subtilis*, выделенных из препарата «Ветом 1.1» отмечался по отношению *Proteus mirabilis* (ЗЗР  $2 \pm 0,3$ мм) и *Staphylococcus aureus* (ЗЗР  $2 \pm 0,3$  мм). Также отмечалось отсутствие антагонистической активности *B. subtilis* по отношению к *Proteus vulgaris*.

В таблице 2 представлены результаты антагонистической активности бактерий *B. clausii*, выделенных из препарата «Энтерожермина», свидетельствующие о способности данных бактерий угнетать рост и развитие большинства исследуемых тест-культур.

Таблица 2. – Антагонистическая активность бактерий *B. clausii*, выделенных из препарата «Энтерожермина», в отношении некоторых условно-патогенных микроорганизмов

Штамм	Антагонистическая активность (зоны задержки роста, мм)		
	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. clausii</i>	$8 \pm 0,3$	–	$12 \pm 0,3$

Наиболее высокая антагонистическая активность бактерий *B. clausii*, выделенных из препарата «Энтерожермина», отмечалась в отношении *Staphylococcus aureus* (ЗЗР  $12 \pm 0,3$ мм).

Таким образом, спорообразующие бактерии рода *Bacillus* показали различный уровень антагонистической активности (слабый - до 10 мм, средний – 10-20мм). Самым активным антагонистом по отношению к условно-патогенной микрофлоре показал себя штамм бактерий *B. clausii*. Их средний уровень антагонистической активности проявился при их совместном культивировании с таким условно-патогенным микроорганизмом, как *Staphylococcus aureus*. Это доказывает эффективность препаратов на основе исследуемой спорообразующей бактерий и также оправдывает возможность расширения сферы её практического использования. Значительно меньшей антагонистической активностью обладали бактерии *B. subtilis*. Наиболее низкий уровень антагонизма *B. subtilis* был показан к *Proteus mirabilis* (ЗЗР  $2 \pm 0,3$ ), что в 4 раза меньше, чем при культивировании с *B. subtilis*, выделенного из препарата «Ветом 1.1».

Резюмируя все выше изложенное, можно утверждать о перспективности использования исследованных штаммов бактерий рода *Bacillus*, учитывая все их достоинства, а именно повсеместное распространение, высокую бактерицидную и бактериостатическую активность данных штаммов бактерий по отношению к условно - патогенным микроорганизмам.

### Список использованных источников

1. Boiko, M. Estimation of the Genus Bacillus Bacterial Strains Antagonist Properties Against Pathogenic Myxomycetes / M. Boiko, M. Patyko, Y. Vintskovs'ka // Ann. of Adv. Agricul. Scienc. – 2017. – № 2. – P. 65-69.
2. Бакулина, Л.Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода Bacillus и их использование в ветеринарии / Л.Ф. Бакулина [и др.]. // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С.48-56.
3. Бейли Н. Статистические методы в биологии / Н. Бейли. – М.: Мир, 2013. – 271 с.

УДК 612.1(075.8)

### ВЛИЯНИЕ ПАЛЬМИТОКСИАЦЕТОНА НА ФУНКЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ

И.А. Новицкий, Н.В. Амаэбери, Г.Н. Семенкова, О.И. Шадыро

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, [ilya.nov42@gmail.com](mailto:ilya.nov42@gmail.com)

Пальмитоксиацетон (ПА) – жирный кетон, образующийся в организме в результате свободно-радикальной фрагментации лизофосфолипидов. Биологическая роль этого кетона не изучена. Ферментативные системы, приводящие к накоплению этого соединения в организме, отсутствуют. Лизофосфолипиды образуются в результате катализируемого фосфолипазами  $A_2$  (ФЛА $_2$ ) гидролиза глицерофосфолипидов, локализованных в биологических мембранах и в липопротеинах [1]. В организме человека преобладают глицерофосфолипиды, в sn-1 положении которых находятся преимущественно остатки пальмитиновой либо стеариновой кислот, причем содержание остатков пальмитиновой кислоты доминирует [2]. Таким образом, при гидролизе таких фосфолипидов и последующей фрагментации образовавшихся лизофосфолипидов, одним из основных продуктов является ПА.

Ранее на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий показано, что взаимодействие лизофосфатидилхолина с активными формами кислорода (АФК) сопровождается фрагментацией липидной молекулы с образованием ПА [3]. Такой АФК-индуцированный неферментативный путь позволяет рассматривать это соединение как потенциальный биомаркер воспаления.

Основным источником АФК в организме являются нейтрофилы и моноциты. Эти клетки мигрируют в очаг воспаления, и уничтожают патогены, генерируя АФК [4]. Продукция АФК фагоцитами может приводить к фрагментации лизолипидов клеточных мембран с образованием пальмитоксиацетона. Этот кетон может проявлять биологическую активность в отношении клеток, в первую очередь клеток крови, и модифицировать их свойства.

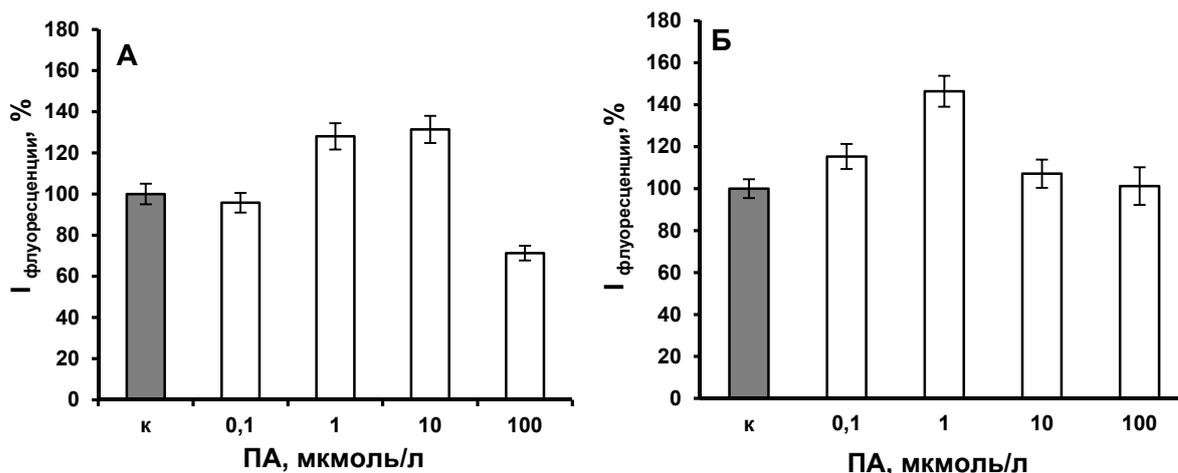
Цель работы: изучить влияние пальмитоксиацетона на функциональные свойства нейтрофилов и мононуклеаров крови здоровых людей.

**Материалы и методы.** В работе использовали декстран, гистопак-1077, питательную среду RPMI-1640, иодида пропициум (PI), бычий сывороточный альбумин (БСА), 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат ( $H_2DCF-DA$ ), Triton X-100, JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид), FCCP (карбонилцианид р-трифторометоксифенилгидразон), *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma», США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х, Беларусь»). ПА был синтезирован на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий.

Нейтрофилы и мононуклеары выделяли из крови здоровых людей по стандартной методике [5]. Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом с использованием иодида пропициума (PI,  $\lambda_{возб} = 530$  нм,  $\lambda_{рег} = 640$  нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) [6]. Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из нейтрофилов [7]. Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом ( $\lambda = 450$  нм) на спектрофлуориметре СМ 2203 («Солар», Беларусь). Генерацию  $H_2O_2$  изучали флуоресцентным методом с помощью зонда  $H_2DCF-DA$  ( $\lambda_{ex} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 530$  нм) на спектрофлуориметре СМ2203 «Солар» (РБ). Продукцию  $H_2O_2$  стимулировали добавлением 0,1 мкмоль/л хемотаксического пептида fMLP. Изменение митохондриального потенциала клеток ( $\Delta\Psi_m$ ) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ( $\lambda_{ex} = 490$  нм,  $\lambda_{em} = 530$  нм, 590 нм) [8]. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм ( $I_{590}/I_{530}$ ) пропорционально  $\Delta\Psi_m$ .

**Результаты и обсуждение.** На начальном этапе работы была проведена оценка токсичности пальмитоксиацетона в отношении нейтрофилов и мононуклеаров. Исследование проводили с использованием флуоресцентного зонда PI. При нарушении целостности мембраны этот краситель проникает в клетку и связывается с ДНК путем интеркаляции между азотистыми основаниями, что сопровождается усилением флуоресценции [9]. Установлено, что инкубирование клеток в течение 30 мин и 4 ч. с ПА в диапазоне концентраций 0,1-100 мкмоль/л не влияет на их выживаемость. Таким образом, пальмитоксиацетон не вызывает гибель клеток по механизму некроза.

Далее нами изучено влияние ПА на способность лейкоцитов продуцировать  $H_2O_2$ . Основным источником АФК в нейтрофилах и моноцитах является фермент НАДФН-оксидаза. При активации этих клеток к фагоцитозу происходит сборка мультиферментного НАДФН-оксидазного комплекса в плазматической мембране и генерация  $O_2^{\cdot-}$ . Образующиеся супероксидные анион-радикалы подвергаются реакции дисмутации, катализируемой ферментом супероксиддисмутазой, с образованием пероксида водорода. На рисунке 1 представлены данные об изменении флуоресценции нейтрофилов и мононуклеаров, нагруженных зондом  $H_2DCF-DA$  и стимулированных к фагоцитозу хемотаксическим пептидом fMLP, в отсутствие и присутствии 0,1-100 мкмоль/л ПА. Видно, что предварительное инкубирование клеток с ПА в концентрации 0,1 мкмоль/л не оказывает влияния на продукцию  $H_2O_2$  нейтрофилами. При увеличении концентрации этого кетона до 1 и 10 мкмоль/л наблюдается рост генерации  $H_2O_2$  на 28 и 31 % по сравнению с контрольными образцами соответственно. Инкубирование клеток с ПА в концентрации 100 мкмоль/л приводит к снижению продукции  $H_2O_2$  на 29 % (рисунок 1 А). В случае мононуклеаров, инкубирование клеток с 0,1 и 1 мкмоль/л ПА приводит к росту продукции  $H_2O_2$  на 15 и 46 % соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого кетона практически не оказывает влияния на генерацию  $H_2O_2$  мононуклеарами (рисунок 1 Б).



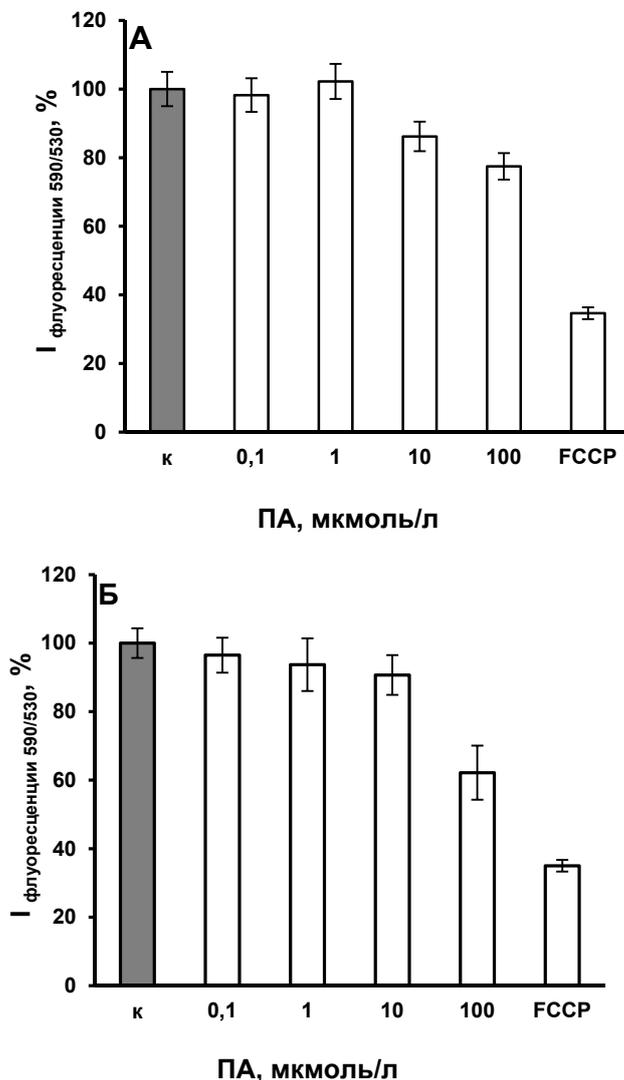
Время инкубирования клеток с ПА – 30 мин  
[fMLP] = 0,1 мкмоль/л

**Рисунок 1. – Влияние пальмитоксиацетона на продукцию  $H_2O_2$  нейтрофилами (А) и мононуклеарами (Б)**

При активации нейтрофилов генерация АФК может сопровождаться секреторной дегрануляцией. Нейтрофилы высвобождают во внеклеточное пространство гранулы, содержащие антимикробные белки, в том числе фермент миелопероксидазу. Усиление секреторной дегрануляции нейтрофилов характерно для ряда патологических состояний, сопровождающихся воспалением, таких как астма, острое повреждение легких, ревматоидный артрит, сепсис и др. [9]. Нами установлено, что инкубирование нейтрофилов с ПА в диапазоне концентраций 1-100 мкмоль/л в течение 30 мин не оказывает влияния на процесс секреторной дегрануляции нейтрофилов.

Важным источником АФК в клетке являются митохондрии [10]. Рост генерации АФК митохондриями может привести к окислительному повреждению митохондриальных белков и ДНК. Кроме того, окислительное повреждение митохондрий приводит к усилению высвобождения белков межмембранного пространства, таких как цитохром с, в цитозоль за счет изменения мембранного потенциала и проницаемости внешней митохондриальной мембраны, и тем самым, индуцирует апоптоз. Величина митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\Psi_m$ ) является важным парамет-

ром, используемым для оценки состояния клетки. Длительная деполяризация или гиперполяризация приводит к нарушению функциональной активности клеток (снижению жизнеспособности), что может стать причиной различных патологий [11]. Мы изучили влияние ПА на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах и мононуклеарах (рисунок 2).



**Рисунок 2. – Влияние пальмитоксиацетона на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах (А) и мононуклеарах (Б)**

Видно, что добавление ПА в концентрации 0,1 и 1 мкмоль/л к суспензии нейтрофилов не оказывает влияния на величину митохондриального мембранного потенциала. При увеличении концентрации этого кетона до 10 и 100 мкмоль/л наблюдается снижение  $\Psi_m$  на 14 и 23 % соответственно. В случае мононуклеаров снижение величины  $\Psi_m$  происходит только при добавлении ПА в концентрации 100 мкмоль/л и составляет 38 %.

Таким образом, ПА, в зависимости от концентрации, способен регулировать продукцию АФК, а также вызывать деполяризацию митохондриальных мембран нейтрофилов и мононуклеаров, что может указывать на активацию процессов клеточной гибели. Поскольку действие ПА на лейкоциты не приводит к некрозу клеток, можно предположить, что это соединение способно индуцировать апоптоз.

#### Список использованных источников

1. Филькин С.Ю. Суперсемейство фосфолипаз: структура, функции и применение в биотехнологии / С.Ю. Филькин, А.В. Липкин, А. Н. Федоров // Успехи биологической химии. – 2020. – Т. 60 – С. 369-410.

2. Gordon, M.H. Fats Classification / M.H. Gordon // Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition) / ed. B. Caballero. – Oxford: Academic Press, 2003. – P. 2287-2292.
3. Shadyro, O. Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids / O. Shadyro, S. Samovich, I. Edimecheva // Free Radic Biol Med. – 2019. – Vol. 144 – P. 6-15.
4. Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes: why, when, and where? / S. Dupré-Crochet, M. Erard, O. Nüße // J. Leukoc. Biol. – 2013. – Vol. 94(4). – P. 657–670.
5. Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // Scand. J. Immunol. – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.
6. Kato, F. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents / F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura // Toxicol. in Vitro. – 1999. – Vol. 13. – P. 923–929.
7. Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme / D. Shugar // Biochim. Biophys. Acta. – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.
8. Sivandzade, F. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe [Electronic resource] / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // Bio Protoc. – 2019. – Vol. 9 (1). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343665/pdf/nihms-1005181.pdf>. – Date of access: 21.05.2021.
9. Lacy, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils / P. Lacy // Allergy Asthma Clin Immunol. – 2006. – Vol. 2, № 3. – P. 98-108.
10. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // Biochem J. – 2009. – Vol. 417, № 1. – P. 1-13.
11. Mitochondrial membrane potential / L.D. Zorova [et al.] // Anal Biochem. – 2018. – Vol. 552 – P. 50-59.

УДК 678.048

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМ С-ОКСИДАЗЫ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПРИ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Д.Э. Подольский, В.Т. Чещевик

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, [dmitrij.podolskij.94@list.ru](mailto:dmitrij.podolskij.94@list.ru)*

**Введение.** Тромбоциты – безъядерные элементы крови, которые происходят от клеток-предшественников – мегакариоцитов в результате гемопоэза. Эти клетки выполняют функцию гемостаза благодаря своей способности активироваться и слипаться, образуя тромб – данный процесс называется агрегацией тромбоцитов. При повреждении кровеносных сосудов, тромбоциты, вступая в контакт с коллагеном эндотелия, начинают перестраиваться, и у них происходит процесс активации. В процессе активации тромбоциты меняют свою форму, благодаря перестройке цитоскелета клетки, а также происходит дегрануляция внутриклеточных гранул – высвобождение катионов кальция, различных факторов свёртывания крови, аденозиндифосфата и т.д. для дальнейшей активации и вовлечения в активационный каскад других тромбоцитов [1]. На конечной стадии активации тромбоцитов через ряд внутриклеточных процессов происходит активация интегрин  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . В результате активации данного мембранного рецептора и его олигомеризации, происходит связывание двух и нескольких тромбоцитов через комплекс двух интегринов  $\alpha_{IIb}\beta_3$  и одной молекулы фибриногена.

Запуск активации также запускается при стимуляции определёнными агонистами, такими как тромбин, аденозиндифосфат (АДФ), серотонин, тромбоксан А2 и другими.

При активации тромбоцитов сильными агонистами (тромбином или коллагеном) выделяют две разные по функциональной активности субпопуляции. Первая субпопуляция обладает плохой способностью к агрегации, однако несёт множество сайтов коагуляции на своей поверхности, на которой происходит экспозиция фосфатидилсерина. Такая субпопуляция называется фосфатидилположительной. Субпопуляция тромбоцитов, не экспонирующая на поверхности фосфатидилсерин, и имеющая хорошую способность к тромбоцитарной агрегации называют фосфатидилсеринотрицательной [2]. В образовании субпопуляции фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов огромную роль играют митохондрии и генерируемые ими активные формы кислорода (АФК).

Активные формы кислорода – это высокоактивные производные кислорода, образующиеся при нормальной работе электрон-транспортной цепи митохондрий в звеньях I и III комплексов и вы-

полняющие прежде всего регуляторную функцию в клетках. Среди АФК различают первичные АФК, которые образуются непосредственно при работе дыхательной цепи (супероксид-анион,  $O_2^-$ ) и вторичные АФК, которые образуются в дальнейшей цепи превращений первичных АФК (пероксид водорода  $H_2O_2$ , радикал гидроксида  $\cdot OH$ ). В естественных условиях такие реактивные молекулы могут приводить к повреждениям биополимеров, поэтому в организмах их обезвреживают специальные антиоксидантные системы (например, витамин Е, глутатион и т.д.). Дисбаланс между продукцией АФК и антиоксидантными механизмами, обусловленный увеличением продукции АФК и/или снижением активности антиоксидантов, приводит к окислительному стрессу, который способствует повреждению белков, липидов и ДНК. Окислительный стресс считается распространенным патофизиологическим механизмом и связан со многими патологическими состояниями, такими как рак, диабет, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания [3].

Основными источниками АФК в тромбоцитах являются изоформы никотинамидаденинуклеотид (фосфат) оксидазы, циклооксигеназа, ксантиноксидаза и митохондриальная дыхательная цепь. Бакдаш и Уильямс предположили, что продукция АФК во время активации тромбоцитов пространственно различна и зависит от агониста тромбоцитов. В литературе данные по этой теме все еще противоречивы. Например, было обнаружено, что коллаген продуцирует либо внутриклеточные, либо внеклеточные АФК, вероятно, из-за его способности связывать и активировать множество рецепторов.

АФК действуют как вторичные посредники и могут влиять на различные сигнальные пути, которые усиливают активацию тромбоцитов, индуцированную агонистами. Различные исследовательские группы продемонстрировали, что активация тромбоцитов коллагеном и тромбином вызывает быстрое и временное увеличение мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_M$ ) и окислительного фосфорилирования, вероятно, за счет мобилизации ионов  $Ca^{2+}$ . Увеличение  $\Delta\Psi_M$  связано с увеличением продукции АФК в митохондриях, а гиперполяризация мембраны уменьшает цепь переноса электронов, что приводит к утечке электронов из цепи с последующим стимулированием производства  $O_2^-$  [4].

При дальнейшей активации тромбоцитов и увеличения генерации АФК приводят к апоптозу митохондрий тромбоцитов и образованию переходной поры проницаемости митохондрий (mPTP). Эти события приводят к возникновению фосфатидилсерин-положительной субпопуляции апоптотических тромбоцитов, содержащих на себе множество сайтов для прикрепления факторов свёртывания крови, имеющую огромную роль для привлечения других тромбоцитов в дальнейший каскад агрегации. Образование mPTP играет ключевую роль в регуляции активации тромбоцитов, индуцируя переход тромбоцитов из «активированного» в «гиперактивированное» состояние, характеризующееся экстернализацией фосфатидилсерина. Кроме того, mPTP и АФК связаны с активацией и транслокацией проапоптотических белков Bid, Bax и Bak в митохондрии. Эти эффекты, вызываемые тромбином, значительно ослабляются каталазой, что указывает на центральную роль АФК в апоптозе тромбоцитов. АФК может непосредственно изменять проницаемость митохондриальной мембраны, приводя к высвобождению проапоптотических факторов, таких как цитохром С и каспазы в цитозоль [5].

Дисбаланс в количестве АФК тромбоцитов может приводить к самым различным патологическим состояниям. Традиционно считают, что основными заболеваниями, связанными с окислительным стрессом тромбоцитов являются многие воспалительные процессы, ожирение, гипертония, сахарный диабет I и II типов. У пациентов с ожирением и гипертонией обычно наблюдаются активированные циркулирующие тромбоциты, повышенная агрегация тромбоцитов и образование агрегатов тромбоциты-лейкоциты, повышенная выработка эндогенных АФК и сниженный антиоксидантный статус. У больных сахарным диабетом II типа нарушается внутриклеточный гомеостаз кальция, вероятно, из-за повышения уровня перекиси водорода и пероксильных радикалов, что приводит к гиперреактивности и гиперагрегируемости тромбоцитов [6].

**Целью** работы явилось изучение генерации АФК при работе электрон-транспортной цепи митохондрий тромбоцитов при их активации при ингибировании IV комплекса дыхательной цепи (цитохром с-оксидазы).

**Материалы и методы.** Для исследования использовали цитратную кровь (соотношение 9:1) от пациентов, не обладающих хроническими заболеваниями, вредными привычками и не имеющих воспалительных процессов в течение 7 дней и не принимающих лекарственных средств в течение 3 дня до забора крови.

Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием цитратной крови при режиме: 1040 об/мин в течение 15 минут. Полученную плазму разбавляли в модифицированном буфере

Тирода с глюкозой (состав буфера: 134 мМ хлорида натрия; 12 мМ гидрокарбоната натрия; 2,9 мМ хлорида калия; 0,34 мМ гидрофосфата натрия однозамещённого; 1 мМ хлорида магния; 10 мМ НЕРЕС; 5 мМ глюкозы) до содержания клеток  $3 \times 10^7$  кл/мл.

Агрегацию запускали с помощью агониста АДФ концентрацией 10 мкМ.

Уровень генерации АФК измеряли с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Canto II с использованием липофильного зонда на цитоплазматические АФК 2,7-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата ( $H_2DCFDA$ ) концентрацией 10 мкМ, обладающего спектром эмиссии в зелёном диапазоне спектра ( $\lambda = 517-527$  нм). Ингибирование IV комплекса осуществляли азидом натрия ( $NaN_3$ ) в концентрации 10 мМ.

В качестве гасителя АФК использовали антиоксидант тролокс (производное витамина E) в концентрации 1 мМ.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования генерации АФК и её ингибирования тролоксом представлены на рисунке 1.

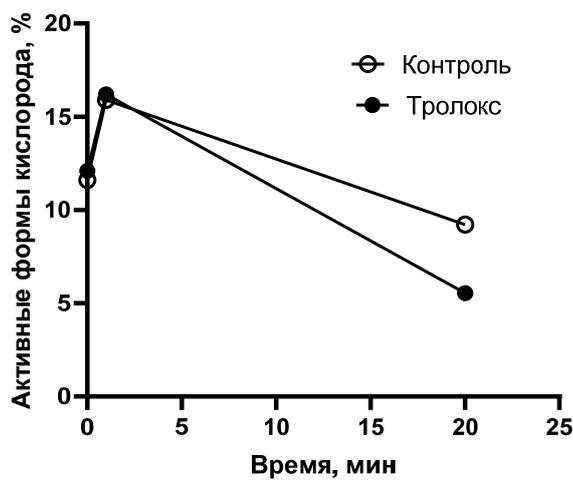


Рисунок 1. – Генерация АФК в присутствии тролокса

Из графика можно заметить, что генерация АФК присутствовала на начале добавления АДФ, а на протяжении 20 минут времени нивелировалась. Тролокс снижал концентрацию активных форм кислорода на конечных этапах инкубации тромбоцитов с АДФ, что можно объяснить антиоксидантным действием тролокса и некоторых витаминов.

Изучалась генерация АФК в присутствии ингибитора IV комплекса дыхательной цепи азид натрия. Данные представлены на рисунке 2.

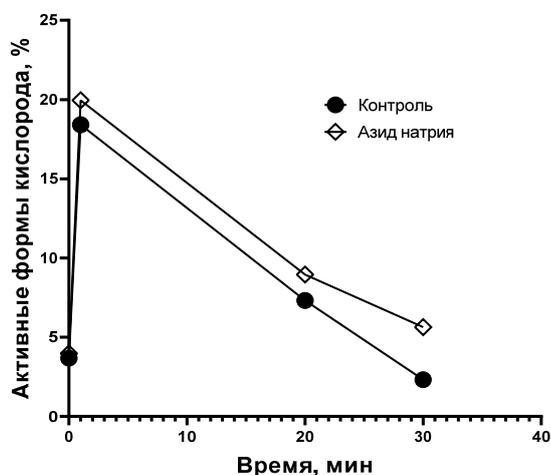


Рисунок 2. – Генерация АФК в присутствии азид натрия

Было выяснено, что ингибирование IV комплекса электрон-транспортной цепи митохондрий азидом натрия в целом повышало генерацию активных форм кислорода на всём протяжении инкубации с АДФ, причём генерация АФК происходила скачкообразно при запуске активации тромбоцитов. Нарушение дыхательной цепи цитохром с-оксидазе может свидетельствовать о том, что ингибирование передачи электронов на молекулярный кислород может индуцировать генерацию АФК, однако данный вопрос всё ещё нуждается в обсуждении. Факт скачкообразного увеличения генерации АФК в обоих случаях может говорить о том, что образование активных форм кислорода происходит на начальных стадиях активации тромбоцитов, и интенсивность такой генерации снижается постепенно с дальнейшими морфофункциональными перестройками тромбоцитов.

**Заключение.** Полученные результаты о генерации активных форм кислорода при ингибировании дыхательной цепи говорят о том, что при активации тромбоцитов большую роль играет выработка АФК, которые не только являются результатом естественного процесса работы ферментов-оксидоредуктаз и дыхательной цепи митохондрий тромбоцитов, но и говорят о регуляторной роли АФК. Явление повышения генерации АФК при ингибировании цитохром с-оксидазы, возможно, свидетельствует о роли IV комплекса дыхательной цепи в тонкой регуляции митохондриального дыхания.

*Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (договор № 65 от 05.05.2021 г., госрегистрация № 20212457).*

#### **Список использованных источников**

1. Holinstat M. Normal platelet function / M. Holinstat // Cancer Metastasis Rev. 2017 Jun; vol. 36, no. 2, pp. 195-198.
2. Lesyk G. Advances in Platelet Subpopulation Research / G. Lesyk, P. Jurasz // Front Cardiovasc Med. 2019; vol. 6, P. 138.
3. Carrim N. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb $\alpha$  / N. Carrim [and etc.] // Redox Biol. 2015; vol. 6, pp. 640-647.
4. Li Z. Signaling During Platelet Adhesion and Activation / Z. Li [and etc.] // Arter. Thromb. Vasc. Biol. 2010; vol. 30, pp. 2341-2349.
5. Bartimoccia S. Platelet Oxidative Stress and Antioxidant Nutrients / S. Bartimoccia [and etc.] // J. Vasc. Med. Surg. 2014; vol. 2, P. 164.
6. Masselli E. ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights / E. Masselli [and etc.] // Int J Mol Sci. 2020 Jul; vol. 21, no. 14, pp. 48-66.

УДК 544.155

### **СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОРБЦИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ОЛИГОПЕПТИДАМИ**

**Т.В. Рябцева, А.Д. Таганович**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, ta-yana@yandex.ru*

**Актуальность.** Цитокиновый шторм как особая форма системной воспалительной реакции является распространенной проблемой современной медицины. Основой патогенеза данного состояния является чрезмерно высокие концентрации в крови таких провоспалительных цитокинов как фактор некроза опухолей альфа (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-8 (ИЛ-8) [1,2]. Гиперпродукция этих цитокинов говорит о том, что интенсивность иммунного ответа в несколько раз превышает резервные возможности организма. При этом происходит повреждение тканей и органов собственной иммунной системой [3]. Основными клиническими проявлениями являются подъем температуры тела, снижение кровяного давления и тромбоз сосудов [4,5]. Одним из терапевтических подходов для лечения цитокинового шторма является использование экстракорпоральных методов, в частности гемосорбции [3]. Однако существующие гемосорбенты не обладают достаточной специфичностью и при их применении происходит удаление всех цитокинов, как про- так и противовоспалительных. Для повышения специфичности сорбции необходима разработка аффинных лигандов, способных к избирательному удалению цитокинов.

Анализ научной литературы показал, что олигопептиды могут быть использованы в качестве аффинных лигандов для гемосорбентов так как они обладают высокой селективностью, низкой

токсичностью, химическим и биологическим разнообразием [6,7]. С помощью методов молекулярного докинга существует возможность предварительного анализа взаимодействия большого числа пептидов с молекулой-мишенью для выбора наиболее эффективных. Именно таким образом, нами ранее был проведен анализ олигопептидов, являющихся аналогами цитокинсвязывающего участка рецепторов к ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Были отобраны олигопептиды с минимальными энергиями связывания, что косвенно свидетельствовало о максимальной силе взаимодействия. Для оценки возможности использования найденных пептидов для производства гемосорбентов необходим анализ их эффективности после иммобилизации на полимерном носителе, а именно на полиакриламидном геле (ПААГ). Так как именно ПААГ используется в качестве полимерного носителя в зарегистрированных к применению в Беларуси и России гемосорбентах.

**Целью** исследования являлось изучение специфичности связывания отобранных ранее олигопептидов с ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Для этого был проведен перекрестный анализ взаимодействия всех отобранных олигопептидов с каждым из исследуемых цитокинов с помощью молекулярного докинга и в экспериментах *in vitro*.

**Материалы и методы исследования.** В работе исследовали олигопептиды, аминокислотная последовательность которых была составлена на основе анализа цитокинсвязывающих участков рецепторов к ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. С помощью молекулярного докинга были определены наиболее эффективные для каждого цитокина олигопептиды. Первую группу составили олигопептиды, являющиеся структурными аналогами цитокинсвязывающей области рецептора к ФНО- $\alpha$ , Trp-Val-Pro (WVP, M=400,00 Да), Trp-Asn-Trp-Val (WNWV, M=604,00 Да) и Trp-Asn-Trp (WNW, M=505,00 Да). Во вторую группу объединили пептиды, аминокислотная последовательность которых была составлена на основе анализа цитокинсвязывающей области рецептора ИЛ-8. Это пептиды Trp-Asp-Phe-Asp (WDFD, M=582,25Да) и Trp-Asp-Phe-Phe (WDFP, M=613,66Да). В третью группу включили пептиды-аналоги рецептора для ИЛ-6: Tyr-Phe-Val (YFV, M=428,20 Да) и Ser-Phe-Tyr-Arg (SFYR, M=571,62 Да). Синтез данных олигопептидов был заказан на производстве Changzhou Xuanming Chemical Co. Ltd., Чанчжоу, Цзянсу, Китай.

Химическую иммобилизацию олигопептидов проводили с помощью реакции радикальной полимеризации акриламида и метилен-бис-акриламида (общий объем реакционной смеси 10 мл) с раствором олигопептида (10  $\mu$ M). Для экспериментов *in vitro* использовали плазму крови с высокой концентрацией ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8. Плазму получали путем активирования крови практически здоровых доноров липополисахаридом *E.coli*. Концентрация цитокинов после активации составляла для ФНО- $\alpha$  1302,68 (1228,26÷1363,81) пг/мл, для ИЛ-8 357,76 (330,01÷385,90) пг/мл, для ИЛ-6 642,41 (619,00÷701,84) пг/мл.

Об эффективности удаления цитокинов иммобилизованными олигопептидами судили по разнице концентрации цитокина до и после взаимодействия плазмы с иммобилизованными на ПААГ пептидами [Blood purification, 2004]. Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики, результаты описывали в виде медианы, 25 и 75 перцентилей.

**Результаты и обсуждение.** Результаты молекулярного докинга показали, что наиболее эффективное связывание всех исследуемых олигопептидов наблюдали с тримером ФНО- $\alpha$  (табл.1). Визуализация данных комплексов показала, что олигопептиды, располагаются между субъединицами молекулы. Этим можно объяснить более выгодное термодинамически эффективное состояние и наименьшую свободную энергию связывания.

Таблица 1. – Перекрестный анализ свободной энергии связывания пептидов с ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8

Олигопептиды, группа	ФНО- $\alpha$ (тример, M=52,5 кДа)	ФНО- $\alpha$ (мономер, M=17,5 кДа)	ИЛ-6 (M=21кДа)	ИЛ-8 (мономер, M=8,8 кДа)	Статистическая значимость различий
1-я (N=60)	7,20 (7,00;7,70)	6,50 (5,80;6,70)	6,80 (6,20;7,20)	6,10 (5,80;6,35)	p=0,001
2-я (N=60)	6,70 (6,50;7,10)	6,00 (5,75;6,10)	6,30 (6,00;6,50)	5,40 (5,20;5,85)	p=0,001
3-я (N=60)	7,35 (6,45;8,10)	6,00 (5,50;6,30)	6,45 (5,95;6,75)	6,70 (6,30;6,85)	p=0,001

Как показали расчеты, олигопептиды первой группы (аналоги рецептора к ФНО- $\alpha$ ) кроме ФНО- $\alpha$  эффективно также связывают ИЛ-6. Олигопептиды 3-й группы (аналоги рецептора к ИЛ-8), как и ожидалось, соединяются с мономером ИЛ-8 с максимальной свободной энергией.

Теоретические расчеты показали, что отобранные пептиды 1-й группы обладают специфичностью к ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. Пептиды 3-й группы наиболее специфичны к ИЛ-8.

Исследования *in vitro* подтвердили результаты расчетов *in silico*. Так олигопептиды 1-й группы наиболее эффективно на 886,86 (762,99;986,37) пг/мл снижали концентрацию ФНО- $\alpha$ . Взаимодействие с другими олигопептидами также приводило к снижению концентрации данного цитокина, однако менее выраженному (табл.2).

Максимальное изменение концентрации ИЛ-8 на 645,72 (533,31;784,05) пг/мл наблюдали после взаимодействия плазмы с иммобилизованными олигопептидами 3-й группы. Следует отметить, что для 3-й группы олигопептидов была характерна высокая эффективность относительно всех исследуемых цитокинов. Вторая группа пептидов (аналоги рецептора к ИЛ-6) была наименее эффективной. Однако, если анализировать все три группы по эффективности сорбции ИЛ-6, то данную группу пептидов можно считать наиболее эффективной по отношению к данному цитокину.

Таблица 2. – Изменение концентрации ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ-8 в плазме крови до и после взаимодействия с иммобилизованными пептидами

Олигопептиды, группа	ФНО- $\alpha$ , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ИЛ-8, пг/мл	Статистическая значимость различий
1-я (N=60)	886,86 (762,99;986,37)	79,38 (37,18;110,21)	467,55 (354,09;581,83)	p=0,001
2-я (N=60)	432,46 (312,94;582,14)	159,11 (141,18;281,43)	358,35 (254,09;485,91)	p=0,001
3-я (N=60)	632,46 (512,82;716,88)	128,83 (94,15;175,77)	645,72 (533,31;784,05)	p=0,001

Результаты данного исследования свидетельствовали о том, что молекулярный докинг может быть использован в качестве предварительного этапа поиска специфических олигопептидов для связывания молекул-мишеней. Было показано, что иммобилизованные олигопептиды, являющиеся структурными короткоцепочечными аналогами цитокинсвязывающей области рецепторов провоспалительных цитокинов, могут быть использованы для снижения их концентрации в плазме крови. Однако высокой специфичности для исследованных олигопептидов относительно отдельных цитокинов обнаружено не было. Все пептиды в большей степени удаляли ФНО- $\alpha$ , в меньшей степени – ИЛ-6. Однако, учитывая синергизм функциональной активности исследуемых цитокинов, можно ожидать, что в организме человека снижение концентрации одного из цитокинов, например ФНО- $\alpha$ , будет приводить к снижению концентрации других провоспалительных цитокинов и в целом к снижению воспалительной реакции.

#### Список использованных источников

1. Tisoncik, J.R. Into the eye of the cytokine storm / J.R.Tisoncik, M.J.Korth, C.P.Simmons etc. // *MMBR*. – 2012. – V.76. – N1. – p.16-32
2. Fajgenbaum, D. Cytokine storm / D.Fajgenbaum, C.H.June // *N Eng J Med*. – 2020. – V.23. – p.2255-2273
3. Ye, Q. The pathogenesis and treatment of the “Cytokine storm” in COVID-19 / Q.Ye, B.Wang, J.Mao // *Journal of infection*. – 2020. – V.13. – p.17-24
4. Потапнев, М.П. Цитокиновый шторм: причины и последствия / М.П. потапнев // *Иммунология*. – 2021. – Т.42. - №2. – с.175-188
5. Shimizu, M. Clinical features of cytokine storm syndrome / M.Shimizu // doi:10.1007/978-3-030-22094-5\_3
6. Lau, J.L. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions / J.L. Lau, M.K. Dunn // *Bioorganic&Medicinal Chemistry*. – 2018. – V.26. – p.2700-2707

7. Menegatti, S. The hidden potential of small synthetic molecules and peptides as affinity ligands for bioseparations / S. Menegatti, A.D. Naik, R.G. Carbonell // Pharm.Bioprocess. – 2013. – V.1(5). – p.467-485.

УДК 615.038

## PROBIOTIC'S BIOTECHNOLOGY FOR PREVENTION AND TREATMENT OF COVID-19

S. Starovoitova

*National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine, Svetik\_2014@ukr.net*

SARS-CoV-2 infection leads to complicated immunologic and pathophysiologic responses in the host. Along with the phenotypic changes in the host, the gut microbiome is broadly altered in COVID-19 patients. Subsequent blooms of opportunistic bacteria, fungi, and viruses under circumstances of SARS-CoV-2 infection and quiescent/overt gut inflammation in COVID-19 pose further threats to host health and gut microbiota restoration. Such expansions in certain microbial species and decreases in microbiome diversity in conjunction with the impaired host immunity may hinder restoration of the gut normobiota post COVID-19. Consequently, the altered gut microbiome ecology persists even after disease resolution. Overall, the intricate microbiome ecological network in a steady state is significantly weakened in COVID-19, shifting to one predominated by COVID-19-enriched microbes [1].

It is well-known that confounding factors such as treatment and diet can significantly affect the gut microbiome composition. However, due to the acute nature of COVID-19, controlling for these confounding factors or including treatment-naïve COVID-19 patients seems infeasible. Therefore, some of the differences between the microbiomes of COVID-19 and controls, and of those between disease stages (i.e., mild vs. severe COVID-19 cases), could be attributed to treatment regimens and/or diet. SARS-CoV-2 infection might be a crucial contributor to the gut microbiome dysbiosis in patients with COVID-19. Although studies have demonstrated that the infection of SARS-CoV-2 would lead to the altered gut microbiome, the causal relationships among the baseline gut microbiome (before infection) that regulates angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and host immune status, infectivity/severity of SARS-CoV-2, and altered gut microbiome after infection are complicated [2-4].

Compositions of the gut microbiome (baseline) favor the infection of SARS-CoV-2, and subsequent infection of SARS-CoV-2 induces the change of gut microbial ecology. Little is known about the relative contribution of the baseline status of the gut microbiome to the later-on infection and the dynamics of the altered gut microbiome. Beyond that, it is also paramount to further understand how the gut microbiome regulates host immunity against SARS-CoV-2 infection, therefore disease severity, as well as the long-term impact of COVID-19 on the gut microbiota restoration in relation to host health after the pandemic.

Thus, nowadays during the SARS-CoV-2 pandemic, when there are no clear therapeutic strategies for prevention and treatment, attention should be paid to alternative treatments, which may include the use of bacteriotherapeutic drugs based on probiotic microorganisms, i.e. representatives of the host normobiota. Experimental data show that changes in immune balance in patients with SARS-CoV-2 may be mediated by corresponding changes in the host intestinal microflora. This statement is especially significant for the elderly, whose intestinal flora is less diverse. Especially the number of useful representative's decreases, which leads to greater sensitivity of the older generation to SARS-CoV-2. The composition and function of the intestinal microbiota may be a potential biological mechanism responsible for the diversity of susceptibility of different groups of people to SARS-CoV-2. A bidirectional connection along the intestine-lung axis due to soluble microbial metabolites transported by the bloodstream is shown. The intestinal microbiota produces many diffusing metabolites with immunomodulatory properties. Given the potential beneficial effects of bacteriotherapeutic drugs and functional foods enriched with probiotic microflora during respiratory viral infection, their use as therapeutic agents during SARS-CoV-2 infection can be considered. Since the microbiota can be maintained using adequate, safe, and relatively inexpensive bacteriotherapeutic drugs (pro-, pre-, para-, post-, synbiotics, immunobiotics, functional foods enriched with probiotic microorganisms, etc.), their use should be considered as adjunctive therapy to limit SARS-CoV-2 progression in infected patients or as a prophylactic strategy for uninfected people at risk during the expansion of SARS-CoV-2 or secondary-tertiary waves [2].

The use of probiotics in COVID-19 patients has been suggested by many investigators, based on the ability of specific probiotics to regulate the immune response (perhaps to calm the "cytokine storm"), or to prevent other types of respiratory infections, including influenza and ventilator-associated pneumonia and to prevent antibiotic associated diarrhea and *Clostridioides difficile* infections [5-7].

Probiotic supplements were considered to be an optimal approach to restore the gut mucosal barrier function in viral pneumonia. Probiotics can bind to Toll-like receptor-4, whose population could increase with the help of inactivated *Lactobacillus salivarius* and fructo-oligosaccharides, thereby competing against harmful bacteria. In addition, probiotics and its metabolic profiles including bacteriocin, hydrogen peroxide, antimicrobial peptides and defensin, help to modulate the local immunity and drive enterocyte and goblet cells to secrete mucus as a consequence to strengthen the mucosal barrier at length.

For COVID-19 patients, SARS-CoV-2 binds its spike proteins to ACE2. ACE2 is highly expressed in the bronchi and gastrointestinal tract to facilitate viral invading and replication. Since the invasive bindings to ACE2, ACE2 located in the gut might not function effectively, potentially altering the symbiotic flora and undermining the intestinal barrier, leading to patients prone to secondary infections. Treatment of an irritant, compared with wildtype littermates, caused gut microbiota alteration to promote profoundly inflammatory reaction in ACE2 mutation mice, which could be directly regulated by microbial agents. Encouragingly, probiotics and prebiotics treatment has been incorporated as adjuvant therapy for critical patients to prevent secondary infections.

Probiotics and prebiotics could be an inspiration for healthcare givers when treating viral pneumonia. This therapy could limit inflammatory responses, stimulate both innate and adaptive immune cells to defend against the viral attacks and preventing secondary infections. Our findings implied a promising target and encourage probiotics or prebiotics to be incorporated into regular treatments for patients infected with respiratory virus, particularly for the patients with severe viral pneumonia [5-7].

There is extensive research investigating the biological roles of the gut microbiota in influencing lung disorders that include asthma, chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchitis, emphysema, lung cancer, pneumonia, pleural effusion, viral and infection. It is also recognized that viral infections in the respiratory tract cause a disturbance in the gut microbiota. The most important probiotics that could be related to decreasing the burden of the COVID-19 pandemic, which included *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Pediococcus pentosaceus*, and *Leuconostoc mesenteroides*. All these probiotics have been added to several products such as DanActive/Actimel fermented drink (Danone), Tribion harmonis (Merck), Shirota, Morinaga, and Medipharm. A recent study conducted in China confirmed that COVID-19 infection affects the balance of natural microbiota in the human intestine based on the observation of reduced counts of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in patients infected by COVID-19 [4].

It has also been reported that COVID-19 can cause severe hypoxemia and changes in the balance of gut microorganisms. On the other hand, a significant reduction of probiotics (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., and *Eubacterium* spp.) was found to significantly increase the number of pathogens (such as *Corynebacterium* spp., *Actinobacteria* spp., and *Ruthenibacterium* spp.) reported that COVID-19 can cause disorders in the human stomach and intestines, however, there is no scientific evidence about the role of COVID-19 in host-microbial flora disorders. Some probiotics that belong to the genus of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* biological activity to control the gastrointestinal dysbiosis caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [1, 4, 5].

Protection by probiotics includes synthesis of antimicrobial agents, immune-modulatory responses, and enhancement of innate host defense. Certain probiotics also have anti-viral effects, including against coronavirus. *Enterococcus faecium* inhibits replication of enteropathogenic coronavirus transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in swine testicular cells. This involves direct interference of virus attachments, adsorptive trapping or virus particle inactivation through surface components of the probiotics and stimulating the synthesis of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 and nitric oxide. Probiotics can also interfere with ACE 2, the primary host receptor of the SARS-CoV-2. For instance, during milk fermentation, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus casei* release peptides with high affinity for ACE. Bovine milk fermented with *Lactobacillus* species yields fermented products enriched with ACE-inhibitory peptides, of which many are resistant to GI digestion and inhibit ACE in the renin-angiotensin system (RAS). In vitro and in vivo experiments have demonstrated antihypertensive effects of fermented milk products [6].

As known, COVID-19 is a multi-organ phenomenon, requiring appropriate systemic inflammatory control for overall survival. Besides, COVID-19 infection expresses new presentations, such as pediatric multisystem inflammatory syndrome, which includes features like Kawasaki disease. "Cytokine storm" or the excessive release of inflammatory cytokines is the reason for severity and death of COVID-19 patients. Therefore, anti-cytokine therapy for the suppression of the hyper inflammatory states is a recommended strategy to treat severe COVID-19. So far, many preclinical studies with probiotics have focused

on influenza and pneumonia, demonstrating benefits from oral or nasal administration of probiotics, which prolonged survival, reduced weight loss, diminished viral loads in the lung, and minimized bronchial epithelial damage. Protection was mediated by immune regulation, distinguished by potent viricidal properties by early recruitment of innate immune system through alveolar macrophages, NK lymphocytes and heightened proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6, etc. This inflammatory boost is followed by a rapid decline, attributed to enhanced anti-inflammatory mediators like Treg cells and IL-10 in the lungs, diminishing lung injuries. Moreover, probiotics' ability to modulate vitamin D/VDR and balancing the composition and growth of gut microbiota, together suggest the immunomodulatory potential in ameliorating the cytokine storm. Therefore, the use of probiotics with anti-inflammatory effects could maintain the equilibrium of intestinal microecology and prevent secondary infection in COVID-19 [2, 6, 7].

**Conclusions.** In view of probiotics supplementation could reduce the severity of COVID-19 morbidity and mortality. Probiotics can inhibit cytokine storm by simultaneously boosting the innate immunity and evading the exaggeration of adaptive immunity, which is challenged to respond quickly to the viral onslaught. Probiotics-induced suppression of the inflammatory cytokine response may prevent both the severity and the occurrence of ARDS, making probiotics an attractive adjunct. Inventing effective therapy will transform the impact of the pandemic on lives as well as economies across the globe. Therefore, supplementation of probiotics in high risk and severely ill patients, and frontline health workers, might limit the infection and flatten the COVID-19 curve.

Thus, the design of different generations of probiotic drugs (pro-, syn-, para-, postbiotics and immunobiotics, etc.) for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 infection is a timely and promising issue in modern biotechnology. As well as a rational combination of probiotic drugs and functional foods enriched with probiotic microorganisms, along with modern treatments can significantly improve and accelerate the recovery of patients with COVID-19.

#### Literature

1. Zuo T., Wu X., Wen W., Lan P. Gut Microbiome Alterations in COVID-19. // *Genomics Proteomics Bioinformatics*. – 2021. - Vol. 21. – P. 1-25. DOI: [10.1016/j.gpb.2021.09.004](https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.09.004)
2. Старовойтова С. О. Взаємозв'язок пробіотиків та SARS-COV-2 (Covid-19) in vivo // *Наукові праці НУХТ*. - 2021. - Том 27, №4. – С. 53- 62. DOI: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-7.
3. Mirzaei R., Attar A., Papizadeh S., Jeda A.S., Hosseini-Fard S.R., Jamasbi E. et. al. The emerging role of probiotics as a mitigation strategy against coronavirus disease 2019 (COVID-19). // *Archives of Virology*. -2021. – Vol. 166, № 7. P. 1819-1840. DOI: 10.1007/s00705-021-05036-8.
4. Khaled J.M.A. Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2021. – Vol. 28. – P. 865-869. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.025.
5. Kullar R., Johnson S., McFarland L.V., Goldstein E.J.C. Potential Roles for Probiotics in the Treatment of COVID-19 Patients and Prevention of Complications Associated with Increased Antibiotic Use. // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10, № 4. – P. 1 – 10. DOI: 10.3390/antibiotics10040408.
6. Zafar N., Aslam M.A., Ali A., Khatoon A., Nazir A., Tanveer Q. et. al. Probiotics: Helpful for the prevention of COVID-19? // *Biomedical Research and Therapy*. – 2020. – Vol. 7, № 11. – P. 4086-4099.
7. Kurian S.J., Unnikrishnan M.K., Miraj S.S., Bagchi D., Banerjee M., Reddy B.S. et. al. Probiotics in prevention and treatment of COVID-19: current perspective and future prospects. // *Archives of Medical Research*. – 2021. – Vol. 16. – P. 1-13. DOI: 10.1016/j.arcmed.2021.03.002.

УДК 611.612.06

#### ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Г.Н. Семенкова<sup>1</sup>, И.Э. Адзерихо<sup>2</sup>, Т.Э. Владимирская<sup>2</sup>, А.М. Серебро<sup>2</sup>,  
Н.В. Амазгери<sup>1</sup>, И.А. Новицкий<sup>1</sup>, А.В. Шулганова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск

<sup>2</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск,

[galina\\_semenkova@yahoo.com](mailto:galina_semenkova@yahoo.com)

**Введение.** Легочная гипертензия (ЛГ) – клинический синдром, объединяющий состояния разнообразной этиологии и патогенеза, характеризующийся повышением легочного сосудистого со-

противления и давления в легочной артерии. Это приводит к развитию правожелудочковой недостаточности и преждевременной гибели пациентов [1]. Ключевую роль в процессе ремоделирования легочных сосудов играет дисфункция эндотелия. Она проявляется, прежде всего, наличием дисбаланса между эндогенными вазодилататорами и вазоконстрикторами, в пользу последних [2]. Патогенез ЛГ интенсивно изучается в экспериментальных моделях *in vivo*. Для ЛГ установлено, что важным фактором, способствующим развитию этой патологии, является воспаление. Доказательством данного утверждения является выявление взаимосвязи между воспалительным процессом и ремоделированием легочных сосудов. Кроме того, в процессе развития ЛГ наблюдается инфильтрация легочной ткани макрофагами, нейтрофилами, Т- и В-лимфоцитами, повышение активности макрофагов/моноцитов, а также увеличение про- и противовоспалительных цитокинов в крови и альвеолярной жидкости [3,4].

Одной из главных причин воспаления при ЛГ может быть возникновение оксидативного стресса, что обусловлено гиперпродукцией активных форм кислорода и хлора (АФКХ). Эти активные интермедиаты продуцируются в очаге воспаления фагоцитами в результате активации супероксидгенерирующей НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО), катализирующей образование главного микробицидного агента и источника свободных радикалов – хлорноватистой кислоты [5,6].  $\text{HOCl}$  вызывает повреждение жизненно важных молекул, что приводит к нарушению клеточных функций и цитодеструкции [7]. Примечательно, что у пациентов с ЛГ в образцах легочной ткани выявлена высокая иммунореактивность в отношении МПО [8]. У этих же пациентов наблюдалось значительное увеличение уровня МПО и нейтрофильной эластазы в плазме крови, что может быть результатом усиления секреторной дегрануляции нейтрофилов.

Учитывая важную роль воспаления в развитии ЛГ, в этом исследовании проанализирована способность нейтрофилов циркулирующей крови пациентов генерировать активные формы кислорода и хлора, поскольку именно эти активные интермедиаты являются потенциальными источниками оксидативного стресса, а их уровень, как правило, возрастает при наличии в организме воспалительного процесса.

**Материалы и методы.** В работе использовали декстран, гистопак-1077, люминол, fMLP, Neres («Sigma», США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х, Беларусь»).

Нейтрофилы выделяли из крови здоровых людей и пациентов с ЛГ в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике [9]. Примесь эритроцитов удаляли с помощью гипотонического лизиса, после чего восстанавливали осмотичность раствора добавлением 0,3 моль/л раствора NaCl. Суспензию клеток дважды отмывали в 0,15 моль/л растворе NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в СБСРЭ (pH 7,2). Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло не менее 96 %.

Генерацию нейтрофилами АФКХ исследовали хемилюминесцентным (ХЛ) методом с применением компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (Минск, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom (Беларусь). Измерения проводили в сбалансированном солевом буферном растворе RPMI (pH= 7,2 -7,4) при  $T=37^{\circ}\text{C}$ . Суммарное количество АФКХ оценивали с помощью люминол-опосредованной ХЛ (Люм-ХЛ). Число нейтрофилов в 1 мл составляло  $1 \cdot 10^6$  клеток. Генерацию нейтрофилами АФКХ наблюдали при активации клеток в процессе адгезии на стекло и стимуляции бактериопептидом fMLP. Интегральную интенсивность оценивали как площадь под кинетической кривой (при стимуляции адгезией – за 10 мин, при действии fMLP – за 5 минут).

Для статистической обработки результатов исследований использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Отличия между контрольной и экспериментальными группами анализировали с помощью теста Даннета. Данные представлены как среднее значение трех и более независимых экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение. Результаты считали достоверными при  $P < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Нами проанализирована способность нейтрофилов крови генерировать АФКХ для 10 здоровых людей и 12 пациентов (9 женщин и 3 мужчин) с ЛАГ, находящихся на лечении в отделении кардиологии Минской областной больницы. Характеристика пациентов с ЛГ представлена в таблице.

Таблица – Сведения о пациентах

№	Пациент	Пол	Возраст	Степень тяжести заболевания	Диагноз
1	В.	жен	28	I, II	Врожденный порок сердца, ЛГ
2	Т.	жен	57	II	Врожденный порок сердца, ЛГ
3	Г.	муж	49	III, IV	Идиопатическая легочная артериальная гипертензия (ИЛАГ)
4	Р.	муж	75	I, II	Врожденный порок сердца, мерцательная аритмия, ЛГ
5	Ст.	жен	61	I, II	Врожденный порок сердца, ЛГ
6	Са.	жен	61	I, II	Врожденный порок сердца, артериальная гипертензия, сахарный диабет, ожирение, ЛГ
7	С.	жен	55	II, III	ИЛАГ, врожденный порок сердца
8	Д.	жен	41	II, IV	ИЛАГ
9	Вд.	муж	28	II, III	ИЛАГ
10	Се.	жен	61	II	Системный склероз, рак легкого, ЛГ
11	Ж.	жен	67	II	Врожденный порок сердца, артериальная гипертензия, ЛГ
12	К.	жен	63	I, II	Системный склероз, ЛГ

Из таблицы 1 видно, что у многих пациентов помимо ЛАГ наблюдались и другие, в том числе сердечно-сосудистые, заболевания. Результаты измерения интегральной интенсивности ХЛ, полученные при стимуляции нейтрофилов здоровых людей и пациентов с ЛГ к фагоцитозу адгезией и хемотаксическим пептидом fMLP, представлены на рисунках 1 - 3. Видно, что параметры ХЛ у различных пациентов были выше, ниже либо такими же, как в группе здоровых людей. Так, при анализе значений Люм-ХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией к стеклу (рисунок 1 и 3 А), было установлено, что, по сравнению с группой здоровых людей, у 4 пациентов вклад в генерацию АФКХ значительно выше (у них наблюдается ЛГ II, III и IV

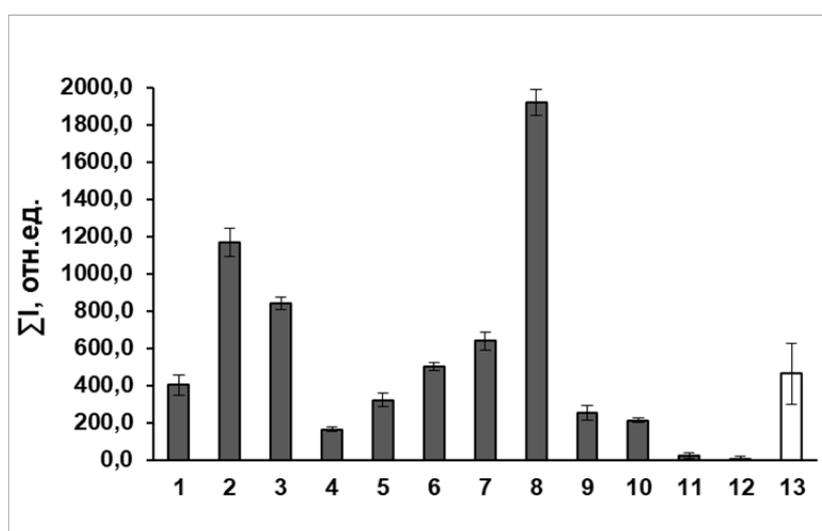


Рисунок 1. – Интегральная интенсивность Люм-ХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией к стеклу (пациенты (1-12), усредненное значение для здоровых людей (13))

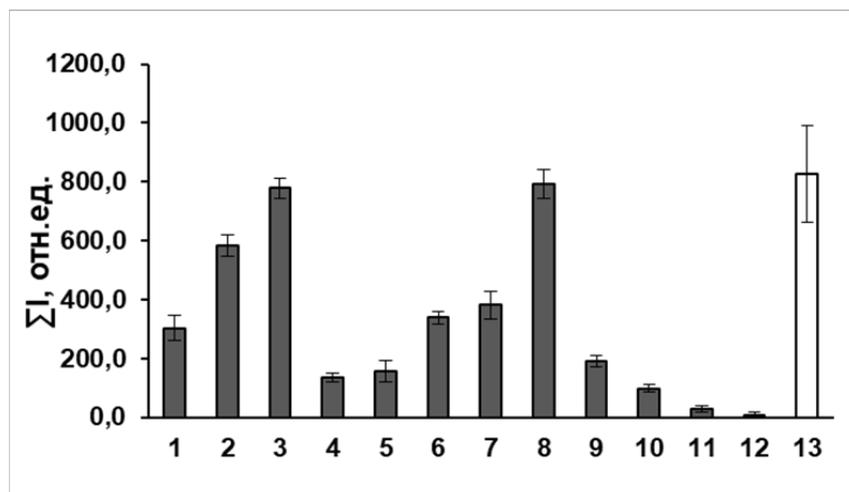


Рисунок 2. – Интегральная интенсивность Люм-ХЛ нейтрофилов, стимулированных fMLP в процессе адгезии к стеклу (пациенты (1-12), усредненное значение для здоровых людей (13))

степень тяжести). Сниженные по сравнению с контрольной группой (здоровые люди) значения интенсивности хемилюминесценции характерны для пациентов с I и II степенями тяжести ЛГ. В случае стимуляции нейтрофилов больных ЛГ хемотаксическим пептидом fMLP у 9 пациентов из 12 с I и II степенями тяжести зарегистрировано значительное снижение образования активных метаболитов кислорода и хлора по сравнению с контролем (рисунок 2 и 3 Б).

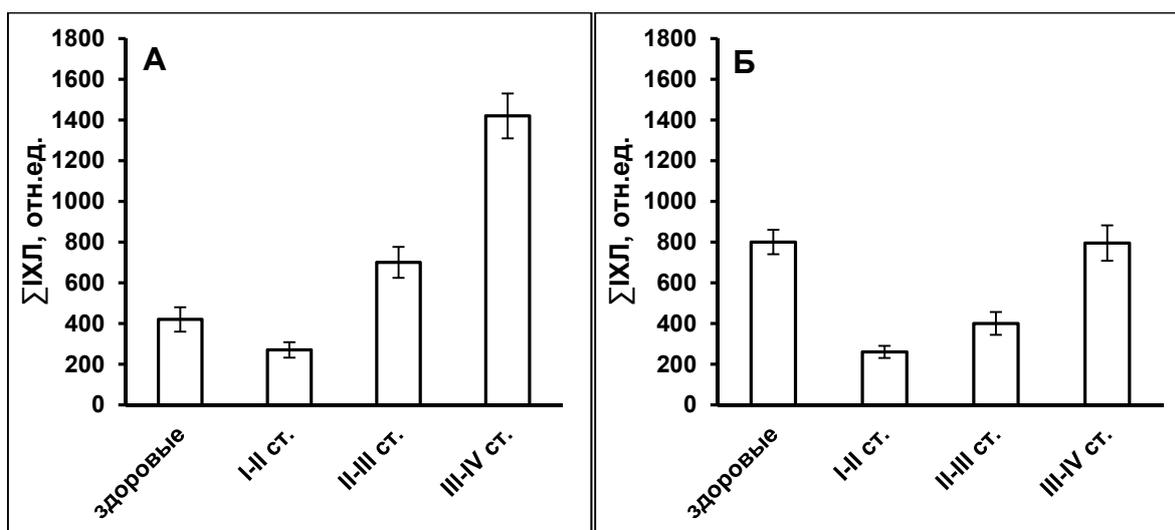


Рисунок 3. – Интегральная интенсивность Люм-ХЛ стимулированных адгезией (А) и fMLP (Б) нейтрофилов здоровых людей и пациентов в зависимости от степени тяжести ЛГ. I – первая, II – вторая, III – третья и IV – степень тяжести заболевания

**Заключение.** В результате анализа полученных данных установлено, что у большинства пациентов с ЛГ изменена способность стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов крови генерировать АФКХ по сравнению с контрольной группой. Известно, что люминол, используемый для регистрации АФКХ, взаимодействует со всеми типами активных метаболитов кислорода и хлора, однако наиболее эффективно этот хемилюминесцентный индикатор реагирует с хлорноватистой кислотой [10]. Поскольку НОСI образуется в галогенирующем цикле МПО, можно заключить, что наблюдаемое нами нарушение способности нейтрофилов генерировать АФКХ у пациентов с ЛГ обусловлено изменением продукции хлорноватистой кислоты, что связано с функционированием этого фермента. Примечательно, что генерация АФКХ клетками пациентов зависит от степени тяжести заболевания. Если для I и II степени тяжести мы зарегистрировали снижение выхода

АФКХ по сравнению с контролем, то с увеличением степени тяжести патологии (II и III, III и IV) наблюдается увеличение выхода АФКХ. Причем, в случае стимуляции нейтрофилов к фагоцитозу адгезией (рисунок 3 А), у пациентов с высокой степенью тяжести ЛГ генерация АФКХ значительно превышает контрольные значения, что свидетельствует о повышенной функциональной активности нейтрофилов за счет увеличения вклада МПО в этот процесс. Можно предположить, что нейтрофилы вовлечены в формирование оксидативного стресса в процессе развития ЛГ.

#### Список использованных источников

1. Rafikova, O. Focus on Early Events: Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension Development / O. Rafikova, I. Al Ghoulch, R. Rafikov // *Antioxidants Redox Signal.* – 2019. – Vol. 31(13). – P. 933–953.
2. Galiè, N. Hoesper MM, Humbert M et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension / N. Galiè [et al.] // *Eur Respir J.* – 2009. – Vol. 34(6). – P. 1219–1263.
3. Tang, C. Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats / C. Tang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – Vol. 133:111081.
4. Chami, H.El. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension / H. El Chami., P.M. Hassoun // *Prog Cardiovasc Dis.* – 2012. – Vol. 55(2). – P. 218–228.
5. Arnhold, J. The dual role of myeloperoxidase in immune response / J. Arnhold // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21(21). – P. 1–28.
6. Kettle, A.J. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant product / A.J. Kettle, C.C. Winterbourn // *Redox Rep.* – 1997. – Vol. 3(1). – P. 3–15.
7. Hawkins, C.L. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins / C.L. Hawkins, D.I. Pattison, M.J. Davies // *Amino Acids.* – 2003. – Vol. 25(3–4). – P. 259–274.
8. Klinke, A. Myeloperoxidase aggravates pulmonary arterial hypertension by activation of vascular Rho-kinase / A. Klinke [et al.] // *JCI insight.* – 2018. – Vol. 3(11).
9. Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.
10. Roshchupkin D, Belakina NS, Murina MA. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminol oxidation. *Biophys.* – 2006. – Vol. 51(1). – P. 99–107.

УДК 577.112.3:616.15-006

#### АМИНОКИСЛОТЫ И ИХ ДЕРИВАТЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

**Н.А. Стубеда, Д.Н. Блоцкая, Л.И. Нефедов**

*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Беларусь, Stub.29@mail.ru*

Доказано, что аминокислоты являются важнейшими соединениями, участвующими в метаболизме азота и синтезе большинства эндогенных биологически активных веществ-биорегуляторов. Экзогенно поступающие аминокислоты, окисляясь, участвуют в энергообеспечении организма и подвергаются многочисленным превращениям. Их метаболизм жёстко контролируется различными биохимическими механизмами, определяющими относительно постоянные физиологические концентрации аминокислот в крови (аминокислотный пул) и тканях (аминокислотный фонд) [1,2].

Убедительно продемонстрировано, что устранение или коррекция изменений промежуточного обмена веществ могут быть достигнуты применением отдельных аминокислот и их дериватов, либо их сочетанием в качестве универсальных природных биорегуляторов – соединений, влияющих непосредственно на механизмы клеточного метаболизма в эндогенных концентрациях [3-5].

В последнее десятилетие получены многочисленные доказательства перспективности применения для терапии атеросклероза биологически активных модуляторов и регуляторов природного происхождения, в частности — аминокислот и родственных соединений, которым принадлежит связующая роль в интеграции и регуляции основных метаболических потоков [3, 4, 6].

Атеросклероз и возникающие на его почве сердечно-сосудистые заболевания за последние десятилетия стали серьёзной общегосударственной проблемой и остаются одной из самых актуальных нерешённых задач медицины во всех высокоразвитых странах мира. Поэтому разработка препаратов антисклеротического действия относится к одному из важнейших направлений современ-

ной биохимии и фармакологии. В связи с этим особенно актуальной является разработка новых принципов и технологии патогенетического лечения атеросклероза.

Кроме того, целым рядом исследований установлено, что первичным при атеросклерозе является нарушение не липидного, а белкового обмена и метаболизма аминокислот. Оказалось, что в большинстве случаев диагностическую значимость имеют групповые и индивидуальные сдвиги в уровнях функционально и метаболически связанных аминокислот и их производных. При этом достаточно высокую информативность имел также характер аминокислотных профилей жидкостей и тканей организма животных и человека [7].

Исследования были проведены в рамках выполнения заданий ГПНИ «Конвергенция» 2016 – 2021 гг. на базе кафедры биохимии ГрГУ имени Янки Купалы (научный руководитель профессор, д-р. мед. наук Нефёдов Л.И.) и отделения лабораторной диагностики Гродненской областной клинической больницы.

Нами установлено, что экспериментальный атеросклероз у крыс характеризуется выраженным аминокислотным дисбалансом, проявляющимся снижением антитоксического индекса Фишера (соотношение концентраций разветвлённых аминокислот лейцина, изолейцина, валина и ароматических тирозина и фенилаланина), дефицитом гликогенных аминокислот (аланина, серина, глицина), а также уменьшением содержания продукта метаболизма серусодержащих аминокислот таурина в тканях и плазме крови (таблица 1 и 2)[8].

Таблица 1. – Свободные аминокислоты плазмы крови ( $\mu\text{M/l}$ ) интактных или содержавшихся на атерогенной диете крыс

Показатель	Контроль	Атерогенная диета
CA	5,8 ± 0,30	9,20 ± 2,45
Tau	265 ± 10,0	211 ± 13,0*
PEA	9,50 ± 1,40	8,00 ± 1,65
Urea	95,70 ± 6,55	130 ± 10,9*
Asp	39,90 ± 2,10	35,60 ± 3,10
Thr	390,0 ± 46,1	475 ± 49,0
Ser	360 ± 39,5	216 ± 12,3*
Asn	58,4 ± 6,08	50,9 ± 10,4
Glu	142 ± 4,41	108 ± 10,5*
Gln	851 ± 33,3	798 ± 22,7
Pro	192 ± 37,2	240 ± 32,1
Gly	592 ± 35,1	350 ± 19,9*
Ala	431 ± 32,8	371 ± 66,9
Ctr	62,2 ± 6,00	50,9 ± 3,35
$\alpha$ -ABA	14,0 ± 2,87	7,70 ± 1,66
Val	17,2 ± 11,0	128 ± 7,20*
Cys	47,8 ± 4,35	55,5 ± 4,95
Met	41,3 ± 3,72	62,7 ± 5,49*
Ile	100,2 ± 5,67	43,6 ± 2,61*
Leu	146,9 ± 8,80	91,3 ± 6,20*
Tyr	74,9 ± 5,10	98,7 ± 5,60*
Phe	61,2 ± 2,45	69,7 ± 4,77
EA	25,50 ± 1,00	24,0 ± 4,11
NH <sub>3</sub>	368 ± 34,0	340 ± 20,0
Orn	95,0 ± 15,9	99,5 ± 9,44
Lys	286 ± 19,0	210 ± 16,0*
His	94,9 ± 5,10	48,7 ± 5,60*
Arg	86 ± 19,0	30 ± 16,0*

P<0,05

Таблица 2. – Свободные аминокислоты печени ( $\mu\text{M/l}$ ) интактных или содержавшихся на атерогенной диете крыс

Показатель	Контроль	Атерогенная диета
CA	169 $\pm$ 13,6	201,6 $\pm$ 30,0
Tau	1910 $\pm$ 131	1683 $\pm$ 125*
PEA	1460 $\pm$ 230	935 $\pm$ 81,5*
Urea	555 $\pm$ 254	486 $\pm$ 29,5
Asp	5132 $\pm$ 425	5774 $\pm$ 342
Thr	910 $\pm$ 123	895 $\pm$ 181
Ser	1741 $\pm$ 380	1615 $\pm$ 174
Glu	2413 $\pm$ 142	1131 $\pm$ 345*
Gln	8930 $\pm$ 276	8815 $\pm$ 335
Pro	2160 $\pm$ 797	2460 $\pm$ 321
Gly	4056 $\pm$ 104	3150 $\pm$ 133*
Ala	3589 $\pm$ 170	1299 $\pm$ 225*
Ctr	76,3 $\pm$ 19,6	92,0 $\pm$ 6,031
$\alpha$ -ABA	22,7 $\pm$ 5,88	29,3 $\pm$ 6,30
Val	196 $\pm$ 23,2	178 $\pm$ 11,4
Cys	40,3 $\pm$ 5,73	49,50 $\pm$ 6,44
Met	29,0 $\pm$ 4,96	34,2 $\pm$ 4,60
Ile	99,0 $\pm$ 10,5	72,9 $\pm$ 6,45
Leu	169 $\pm$ 21,4	144 $\pm$ 6,73
Tyr	165 $\pm$ 14,6	174 $\pm$ 10,7
Phe	105 $\pm$ 16,6	101 $\pm$ 6,65
EA	325 $\pm$ 15,6	244 $\pm$ 21,2*
NH <sub>3</sub>	3130 $\pm$ 448	2677 $\pm$ 200
His	59 $\pm$ 10	33 $\pm$ 13*
Orn	461 $\pm$ 48	445 $\pm$ 56
Lys	459 $\pm$ 40	383 $\pm$ 23
Arg	47 $\pm$ 5,1	19 $\pm$ 6,0*

P<0,05

В сравнительных исследованиях закономерностей формирования аминокислотного пула плазмы крови практически здоровых доноров и больных атеросклерозом с применением методов математического моделирования нами получены предварительные результаты, предполагающие эффективность применения отдельных аминокислот или их композиций в лечении атеросклероза и его осложнений.

#### Список использованных источников

1. Lubec, C. Amino Acids (Chemistry, Biology, Medicine) / C. Lubec. - N Y.: Escom, 1990.- 1196 p.
2. Нефёдов, Л.И. Таурин (биохимия, фармакология, медицинское применение) /Л.И.Нефёдов. – Гродно.: ГрОУТ. - 1999.- 145с.
3. Fafournoux, P. Amino acid regulation of gene expression / Fafournoux, P., Bruhat, A., Jousse, C.// BioChem. J. – 2000.- V.351.- №1.- p.1–12.
- 4 Meijer, A. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways/ Meijer, A// J. Nutr.- 2003.- V6.- №1.- p.2057-2062.
5. Wu, G Important roles of dietary taurine, creatine, carnosine, anserine and 4-hydroxyproline in human nutrition and health / G.Wu // Amino Acids. - 2020. – Vol. 208.- P.329–360.- <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02823-6>
6. Ananieva E. Targeting amino acid metabolism in cancer growth and anti-tumor immune response / E.Ananieva // World J Biol Chem. – 2015.– V.6.-V4.- 281–289 p. doi: 10.4331/wjbc.v6.i4.281.
7. Bruhat, A. Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms / A. Bruhat, Y.Cherasse, C.Chaveroux, C//Biofactors. -2009.- V35.- №3.- p.249-257.
8. Karavay P. A. Amino acids in Metabolomics: Perspective for the Use of Regulatory effects of Free Amino Acids in the Creation on their Basis of Infusion Solutions/ P.Karavay, L.Nefyodov,

УДК 579.61

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *CANDIDA SPP*

И.С. Черней, А.Н. Широкова, В.Т. Чещевик

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, [semiteko.i@yandex.ru](mailto:semiteko.i@yandex.ru)

**Введение.** Дрожжеподобные грибы рода *Candida* представляют собой аэробные одноклеточные организмы. Являются условно-патогенными [5]. Состоят из клеток овальной формы, псевдогиф и септированных гиф размером до 8 мкм, размножающихся почкованием. Половая стадия отсутствует (дейтеромицеты) [2].

Существует более 150 видов грибов этого рода, которые более правильно классифицировать по их способности вызывать патологический процесс. К наиболее часто встречающимся относят виды: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*. Реже встречаются: *C. rugosa*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* [3].

Большинство видов *Candida spp.* являются ассоциантами нормальной микрофлоры тела человека и животных [1]. Но данный род грибов при чрезмерном росте может привести к серьезным заболеваниям.

Кандидоз представляет собой хроническую антропонозную оппортунистическую грибковую инфекцию, как правило возникающую у людей со сниженным иммунитетом, отличающуюся полиморфизмом проявлений от бессимптомного кандидоносительства до генерализованных форм [6].

Для выявления заболевания необходима лабораторная диагностика, состоящая из трех этапов:

1. Получение накопительной культуры;
2. Получение чистой культуры;
3. Идентификация выделенной культуры гриба.

Для получения накопительной культуры необходимо создать элективные условия, которые обеспечат развитие преимущественно исследуемой группы микроорганизмов. Методы накопления имеют целью добиться увеличения относительного количества данного микроорганизма за счет создания благоприятных условий для его роста и выживания по сравнению с другими или путем пространственного отделения его из популяции.

Качество накопительной культуры непосредственно влияет на следующие этапы исследования, поэтому важно с самого начала работы с культурой выбрать правильные условия для работы с ней. У большинства видов дрожжей минимальная температура роста находится в пределах от 0 до 5 °С, а максимальная от 30 до 40 °С. Почти все дрожжи могут расти при комнатной температуре от 20 до 25 °С [4]. Оптимальные значения рН для роста большинства дрожжевых грибов находятся в области средней кислотности (рН 4-6). Однако отдельные виды способны развиваться в более кислой среде. Дрожжи, которые могли бы расти при щелочных значениях рН (8 и более), не известны [4].

Целью исследования явилось определение оптимальных условий культивирования *Candida spp.* для получения накопительной культуры.

**Материалы и методы.** Для исследования роста клеток дрожжей рода *Candida* использовали следующие питательные среды: среда Чапека, МПА (мясопептонный агар), Сабуро (жидкая и плотная), среда Сабуро с левомицетином, YPD (дрожжевой агар-пептон-декстроза), среда Кристенсена с мочевиной, Гисса (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, маннит), фетальная бычья сыворотка.

Для определения оптимальных условий культивирования был произведен пересев маточной культуры *Candida* на жидкую питательную среду (бульон Сабуро). Термостатировали при температуре  $37 \pm 1$  °С 24 ± 3 ч. Через 24 часа инкубирования методом десятикратных разведений получили разведения от исходного до разведения  $10^{-5}$  и пересели на пять твердых питательных сред описанных выше. Культивирование проводилось при трех температурных режимах ( $24 \pm 2$  °С,  $30 \pm 1$  °С,  $37 \pm 1$  °С). Через 24 – 48 ч определяли результат.

Для подтверждения роста колоний *Candida spp.* использовали среды Гисса с глюкозой, сахарозой, мальтозой, лактозой, маннитом, а также среду Кристенсена с мочевиной. Микробиологической петлей делали посев уколом в среду Гисса и штрихом по скошенной поверхности среды Кристенсена, инкубировали 24-28 часов при температуре  $37 \pm 1$  °С. Также провели тест на образование ростковых (зародышевых) трубок (дифференциация *C. albicans* от других видов кандид). Для проведения теста необходима 24-часовая чистая культура. Для этого колонию с видимыми признаками рода *Candida* пересеяли в пробирку со средой Сабуро с левомицетином и термостатировали при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение 24 ч. Далее колонию 24-часовой культуры внесли в пробирку с 1,0 мл стерильной фетальной бычьей сывороткой и выдерживали в течение 3 ч при температуре  $37 \pm 1$  °С. После инкубации проводилось микрокопирование.

Статистический анализ проводили методами вариационной статистики при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим сравнением данных экспериментальных групп с группой контроля. Различия между исследованными группами признавались статистически достоверными при  $p < 0,05$ . Результаты представлены как средние арифметические  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическая обработка проведена с использованием программы статистического анализа GraphPad Prism7.

**Результаты и их обсуждение.** Определение оптимальных условий культивирования производили по методике, описанной выше. После периода инкубации оценивали полученные данные.

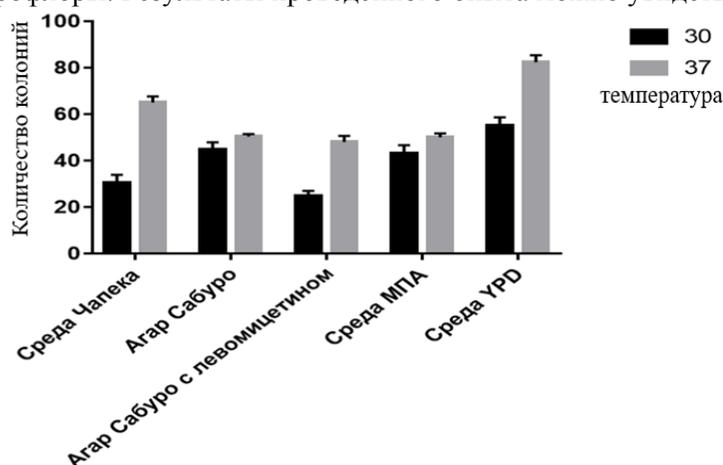
При температуре  $24 \pm 2$  °С рост на средах с посевов исходного разведения отсутствует.

При температуре  $30 \pm 1$  °С через 24 часа рост отсутствует на среде Чапека и на МПА. При просмотре чашек со средами Сабуро, Сабуро с левомицетином и среде YPD с исходным разведением отмечается слабый рост, характерный для рода *Candida* – мелкие округлые блестящие выпуклые беловато-кремовые колонии сметанообразной консистенции. Через 48 часов на всех средах отмечается рост микроорганизмов. На среде Чапека очень мелкие беловатые колонии. На среде Сабуро, среде Сабуро с левомицетином, на МПА сливающиеся мелкие колонии белого цвета. На агаре YPD отмечается сильный рост выпуклых сливающихся колоний белого цвета.

При просмотре посевов с разведения для подсчета колоний приемлемый рост оказался на разведении  $10^{-5}$ . Подсчет проводили также через 48 часов термостатирования. При этом отмечается небольшой рост посторонней микрофлоры.

При просмотре чашек при температурном режиме  $37 \pm 1$  °С через 24 часа отмечается рост на всех средах. Через 48 часов на среде Чапека заметен равномерный рост мелких одинаковых колоний белого цвета. На среде Сабуро и среде Сабуро с левомицетином также отмечается рост мелких белых колоний по всей поверхности среды. На МПА заметен сплошной сливающийся рост колоний белого цвета, по краям роста отмечаются мелкие выпуклые колонии белого цвета. На среде YPD отмечается бурный рост крупных белых выпуклых колоний сметанообразной консистенции.

При просмотре посевов с разведения для подсчета колоний приемлемый рост оказался на разведении  $10^{-5}$ . Подсчет проводили также через 48 часов инкубации. При этом отмечается небольшой рост посторонней микрофлоры. Результаты проведенного опыта можно увидеть на рисунке 1.



**Рисунок 1. – Зависимость количества выросших колоний от температурного режима и типа питательной среды**

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что наиболее подходящим температурным режимом является 37 °С, а оптимальной средой – YPD.

Для подтверждения роста колоний, характерных для *Candida spp.*, провели идентификацию культуры. Для этого были проведены биохимические тесты для определения сахаролитических свойств культуры (способность ферментировать глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, маннит), а также тест на уреазную активность. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица – Сахаролитические свойства и уреазная активность культуры *Candida*

Наименование среды	Результат через 48 ч
Среда Гисса с глюкозой	+
Среда Гисса с сахарозой	+
Среда Гисса с мальтозой	+
Среда Гисса с лактозой	0
Среда Гисса с маннитом	0
Среда Кристенсена с мочевиной	0

Примечание – результат позитивный - +, негативный – 0.

Суть данного метода заключается в том, что определенные сахара могут быть использованы культурой гриба в качестве источника углерода, а именно способность гриба сбраживать определенные сахара. Сравнивая полученные результаты с литературными данными, мы можем утверждать, что в наших исследованиях используется культура рода *Candida*.

Кроме того, был проведен тест на образование ростковых (зародышевых) трубок (дифференциация *C. albicans* от других видов кандид). После инкубации в термостате большую каплю содержимого пробирки поместили на предметное стекло и исследовали под микроскопом. Обнаружили образование дрожжевыми клетками филаментов – ростовых (зародышевых) трубок. Последние являются предшественниками истинных гиф, которые могут быть образованы только грибами рода *Candida albicans*. Для истинных герминантных трубок, образуемых *Candida albicans*, характерно отсутствие сужения в основании трубки, там, где она образуется из материнской клетки, что видно на рисунке 2.



Рисунок 2. – Ростковая трубка *C. albicans*

Основываясь на полученных результатах биохимических тестов и микроскопического анализа, можно утверждать, что был исследован рост культуры *Candida albicans*, а также определены оптимальные условия культивирования *Candida spp.*

### Список использованных источников

1. Зверев, В.В. Основы микробиологии и иммунологии / В.В. Зверев, М.Н. Бойченко [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. - 368 с.
2. Покровский, В.И. Медицинская микробиология / В.И. Покровский, О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 1184 с.
3. Потехаев, Н.Н. Дерматология: Справочник практикующего врача / Н.Н. Потехаев. – Москва: «Литтерра», 2005. – 376 с.
4. Cannon, R.D. Oral colonization by *Candida albicans* / R.D. Cannon, W.L. Chaffin // Crit Rev Oral Biol – 1999. - № 10 (3). - 359-383 p.
5. Méar, J.-B. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* interactions: More than an opportunistic criminal association? / J.-B. Méar [и др.] // Médecine et Maladies Infectieuses. – 2013. - № 4 (43). – p. 146–151.
6. Yu, Z. Partial characterization of a *Candida albicans* fimbrial adhesin / Z. Yu, K.K. Zee, K. Ens, P.C. Doig, M.R. Carpenter, W. Staddon // Infect Immun. - 1994. - № 62 (7). – p. 2834-2842.

УДК 579.678:641.435

### ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS* НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ *IN VITRO*

А.С. Якубович, С.В. Мальцева, Е.Р. Грицкевич

МГЭИ имени А.Д. Сахарова БГУ, Минск, Беларусь, [anya.yakubovich.00@inbox.ru](mailto:anya.yakubovich.00@inbox.ru)

Одним из распространенных семейств микроорганизмов человека и животных выступают энтеробактерии. Известными представителями являются бактерии рода *Proteus*. Эта группа особо устойчива к различным физическим и химическим воздействиям. Среди данного рода особо выделяются виды *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*. Их штаммы широко распространены в окружающей среде, они могут быть обнаружены в самых разнообразных средах, включая почву, желудочно-кишечный тракт, водные источники и сточные воды. Так как бактерии этого вида являются условно патогенными, они часто становятся причиной различных форм инфекций у человека [1]. Бактерии рода *Proteus* могут вызывать серьезные отравления у человека через пищевые продукты (фарш, вареные пастеризованные, кровяные и ливерные колбасы, студни, мясные салаты, рыбные и овощные блюда), а также гнойно-воспалительные процессы в различных органах (прежде всего мочевыводящей системы).

Пищевая токсикоинфекция – это одна из главных проблем нашего времени. Отравление наступает при отсутствии систем профилактики, мониторинга, контроля инфекции, при употреблении в пищу недостаточно термически обработанных и неправильно хранящихся пищевых продуктов, в которых происходит размножение и накопление возбудителя.

Одним из способов борьбы с пищевыми токсикоинфекциями и гнойно-воспалительными процессами, вызванными бактериями рода *Proteus*, является применение антибиотиков. Эти препараты оказывают лечебное действие. В настоящее время во всем мире стремительно растет интерес к антибактериальным препаратам, оказывающим регулирующее действие на организм человека.

Эффективность действия антибиотиков на бактериальные клетки может зависеть от факторов внешней среды, потенциально способных как повысить чувствительность микроорганизмов к препаратам, так и снизить ее. С целью получения качественных антибактериальных препаратов для снижения риска возникновения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями рода *Proteus*, необходимо изучение основных стрессовых воздействий на микроорганизмы, влияющих на их выживаемость – процессов замораживания и хранения. Сведений по влиянию температуры культивирования на антибиотикочувствительность бактерий рода *Proteus* на данный момент имеется недостаточно [2].

Стандартные методы оценки антибиотикочувствительности осуществляются в идеальных условиях (на богатой питательной среде, оптимальной температуре и так далее), что не отражает реальных условий существования бактерий. При этом формирование стресса (при голодании, нарушении проницаемости мембраны, низкой температуре) может индуцировать в клетке защитные механизмы, повышающие устойчивость к факторам внешней среды [3].

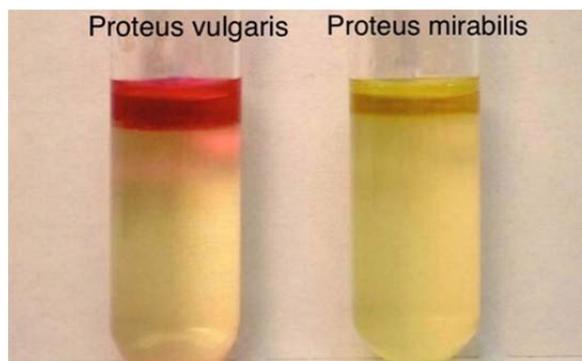
В ходе работы нами был проведен анализ влияния условий культивирования чистых бактериальных культур рода *Proteus*, выделенных из вареных пастеризованных колбасных изделий с ис-

текающим сроком годности, на чувствительность к антибактериальным препаратам *in vitro*. Анализ чувствительности бактерий рода *Proteus* осуществлялся после инкубации в течении 1-5 суток данных микроорганизмов в различном температурном диапазоне: +22°C, +4°C, -20°C.

В результате исследования были выделены и идентифицированы чистые бактериальные культуры *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris* (рисунок 1,2) из образца «Докторская» производителя №2, который был взят за 3 дня до истечения срока годности, хранящегося при температуре 4°C. В результате исследования установлено, что содержание бактерий в данном образце составило  $1-3 \cdot 10^3$  КОЕ/г. Данное количество может указывать на то, что вареное пастеризованное колбасное изделие не является безопасным для употребления в пищу и может спровоцировать пищевую токсикоинфекцию, вызванную бактериями рода *Proteus*. В вареных пастеризованных колбасных изделиях «Докторская» производителя №1, №3 бактерии рода *Proteus* не были обнаружены.

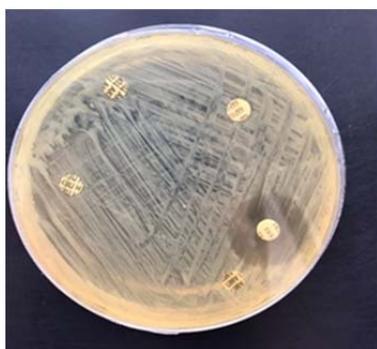


**А**  
Рисунок 1. – Рост бактерий рода *Proteus* на дифференциально-диагностической среде Мосселя (А)

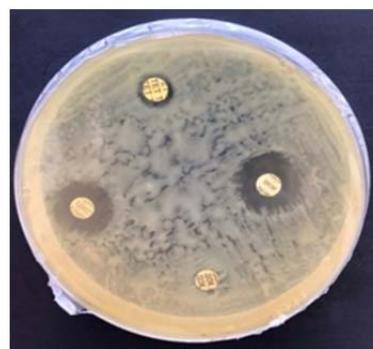


**В**  
Рисунок 2. – Идентификация бактерий рода *Proteus* в вареных пастеризованных колбасных изделиях с истекающим сроком годности: тест на индол при помощи реактива Эрлиха (В)

Был проведен анализ чувствительности бактерий рода *Proteus* к антибактериальным препаратам *in vitro* в стандартных условиях роста микроорганизмов (+22°C – рисунок 3,4). Показано, что бактерии *Proteus mirabilis* проявили наибольшую чувствительность к тикарциллину (10 мкг) –  $18 \pm 0,9$  мм (1 сут.),  $16 \pm 0,8$  мм (5 сут.). Была отмечена высокая чувствительность *Proteus vulgaris* к тикарциллину (10 мкг) –  $20 \pm 1$  мм (1 сут.),  $18 \pm 0,9$  мм (5 сут.) и цефотаксиму (30 мкг) –  $20 \pm 1$  мм (1 сут.). Бактерии рода *Proteus* оказались резистентны к действию амоксициллина (20 мкг), ампициллина (10 мкг), карбенициллина (100 мкг), пенициллина (10 мкг), цефалотина (30 мкг), цефазолина (10 мкг), ванкомицина (30 мкг), кетоконазола (20 мкг), клотримазола (10 мкг). Также отмечалась резистентность *Proteus mirabilis* к левомицетину (30 мкг), гентамицину (120 мкг) и ципрофлоксацину (5 мкг); *Proteus vulgaris* к стрептомицину (30 мкг) и доксициклину (30 мкг).



**А**  
Рисунок 3. – Рост *Proteus mirabilis* в присутствии антибиотиков группы пенициллинов: А (+22°C, 1 сут.)

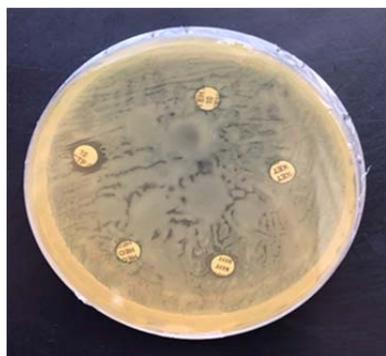


**В**  
Рисунок 4. – Чувствительность *Proteus vulgaris* к антибиотикам групп тетрациклинов и макролидов: В (+22°C, 1 сут.)

Также проводилось исследование влияния низких температур (+4°C) на чувствительность бактерий рода *Proteus* к антибактериальным препаратам *in vitro* (рисунок 5,6). Была отмечена высокая

чувствительность бактерий *Proteus vulgaris* к тикарциллину (10 мкг) –  $16 \pm 0,8$  мм (1 и 5 сут.). Устойчивость бактерий рода *Proteus* наблюдалась к действию амоксициллина (20 мкг), ампициллина (10 мкг), карбенициллина (100 мкг), пенициллина (10 мкг), цефалотина (30 мкг), цефазолина (10 мкг), ванкомицина (30 мкг), кетоконазола (20 мкг), клотримазола (10мкг). По отношению к другим антибактериальным препаратам наблюдалась разная степень чувствительности бактерий рода *Proteus*.

Изучение влияния низкотемпературного воздействия на клетки бактерий рода *Proteus* показало, что данные микроорганизмы проявляют высокую чувствительность к такому стрессовому воздействию.



**А**

**Рисунок 5. – Чувствительность *Proteus mirabilis* к антибиотикам групп производных имидазола, нитрофуранов и амфениколов: А (+4°C, 1 сут.)**



**В**

**Рисунок 6. – Рост *Proteus vulgaris* в присутствии антибиотиков групп аминогликозидов и фторхинолонов: В (+4°C, 1 сут.)**

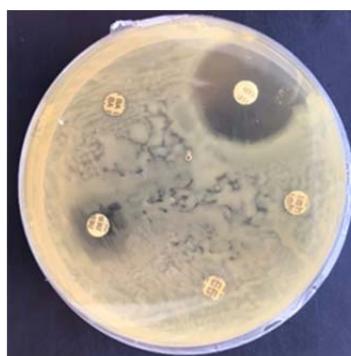
Была проанализирована чувствительность бактерий рода *Proteus* при низкотемпературной обработке (-20°C) к антибактериальным препаратам *in vitro* (рисунок 7,8). Высокая чувствительность бактерий *Proteus mirabilis* наблюдалась к действию тикарциллина (10 мкг) –  $18 \pm 0,9$  мм (1 сут.),  $20 \pm 1$  мм (5 сут.); норфлоксацина (10 мкг) –  $16 \pm 0,8$  мм (1 сут.); Бактерии *Proteus vulgaris* проявили наибольшую чувствительность к тикарциллину (10 мкг) –  $20 \pm 1$  мм (1 сут.),  $24 \pm 1,2$  мм (5 сут.) и цефотаксиму (30 мкг) –  $24 \pm 1,2$  мм (1 сут.),  $20 \pm 1$  мм (5 сут.). Бактерии рода *Proteus* оказались резистентны к амоксициллину (20 мкг), ампициллину (10 мкг), карбенициллину (100 мкг), пенициллину (10 мкг), цефалотину (30 мкг), цефазолину (10 мкг), ванкомицину (30 мкг), кетоконазолу (20 мкг), клотримазолу (10мкг). Также отмечалась устойчивость *Proteus mirabilis* к цефотаксиму (30 мкг), гентамицину (120 мкг) и ципрофлоксацину (5 мкг); *Proteus vulgaris* к стрептомицину (30мкг).

Было показано, что низкотемпературное культивирование может влиять на антибиотикочувствительность бактерий рода *Proteus*.



**А**

**Рисунок 7. – Рост *Proteus mirabilis* в присутствии антибиотиков группы пенициллинов: А (-20°C, 5 сут.)**



**В**

**Рисунок 8. – Чувствительность *Proteus vulgaris* к антибиотикам группы цефалоспоринов: С (-20°C, 1 сут.)**

Было установлено, что антибиотикочувствительность увеличивается при изменении температурных показателей в сторону их снижения, что позволяет моделировать эффективность антибактериальных препаратов.

Полученные данные предоставляют новые знания о чувствительности бактерий рода *Proteus* к антибактериальным препаратам при различных условиях культивирования. Результаты могут быть использованы при разработке методических рекомендаций по изучению влияния низкотемпературного стресса на чувствительность бактерий рода *Proteus* к антибактериальным препаратам *in vivo*.

#### **Список использованных источников**

1. Бабичев, С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / С.А. Бабичев, А.И. Коротяев. – СПб.: СпецЛит, 2008. – 406 с.
2. Бриан, Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам / Л.Е. Бриан. – Москва: Медицина, 2000. – 270 с.
3. Виноградова, К.А. Устойчивость бактерий рода *Proteus* к антибиотикам. Антибиотики и химиотерапия / К.А. Виноградова, В.Г. Булгакова. – М.: МИА, 2013. – С. 45-51

# НАУЧНЫЕ АСПЕКТЫ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭНЕРГОСБЕРЕЖЕНИЕ

УДК 504.5:574

## УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАСОЛЕНИЮ У ВИДОВ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ОЗЕЛЕНЕНИЯ ГОРОДСКИХ ПРОСТРАНСТВ

А.В. Башилов, А.Г. Шутова, Е.А. Седун, Е.А. Войцеховская

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск

Актуальность работы подтверждается интересом на всех уровнях к проблемам озеленения городов и придорожных полос и имеет выраженный экономический, экологический и социальный эффекты в дальнейшем. Несмотря на общемировую тенденцию по привлечению дикорастущих растений в городские посадки, научные основы использования аборигенных видов флоры в озеленении в условиях высокой засоленности не разработаны до настоящего времени, что ставит перед исследователями серьезную научную задачу.

Цель работы – лабораторная диагностика на устойчивость к засолению у аборигенных видов Беларуси перспективных для озеленения городской среды.

Использовались семена буквицы лекарственной (*Betonica officinalis* L., *Lamiaceae*), василька лугового (*Centaurea jacea* L., *Asteraceae*), коровяка черного (*Verbascum nigrum* L., *Scrophulariaceae*), короставника полевого (*Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult., *Dipsacaceae*), подмаренника желтого (*Galium verum* L., *Rubiaceae*), пупавки красильной (*Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay, *Asteraceae*), пупавки полевой (*Anthemis arvensis* L., *Asteraceae*), смолки клейкой (*Viscaria vulgaris* Bernh., *Caryophyllaceae*), тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L., *Asteraceae*) собранные в 2020 году. Семена в количестве 100 шт. проращивались в чашках Петри на фильтровальной бумаге и свету, куда вносились вода (в качестве контроля), хлорид натрия в концентрации 5, 10, 20, 50 г/л.

Процент проросших семян и ростовые показатели анализировали на 4, 8 и 14-е сутки после замачивания семян. Результаты экспериментов были представлены в виде средних арифметических со стандартными ошибками, статистическую значимость различий рассчитывали для 95% уровня значимости ( $p < 0,05$ ). Также было проведено исследование морфологии корней с использованием светового микроскопа со встроенной камерой «ЛОМО МСП 1». Полученные результаты обработаны с помощью статистического пакета программ «М. Excel».

При засолении наблюдалось полное подавление прорастания семян в концентрациях выше 20 г/л у всех изученных видов растений. При концентрации 10 г/л полностью отсутствовал рост у таких видов как *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay, *Anthemis arvensis* L., *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult, *Betonica officinalis* L., *Centaurea jacea* L., *Verbascum nigrum* L. При 5 г/л также наблюдалось полное подавление прорастания у *Galium verum* L.

Концентрация хлорида натрия 10 г/л приводила к значительному подавлению прорастания *Achillea millefolium* L. и составляла не более 8%. Причем наблюдалась задержка в скорости прорастания. Концентрация 5 г/л не вызывала существенного снижения всхожести семян *Achillea millefolium* L.

Всхожесть семян *Centaurea jacea* L. была несколько ниже при концентрации 5 г/л, на 8-е сутки установлено достоверное снижение всхожести при засолении с 48 до 40%.

Всхожесть семян *Viscaria vulgaris* Bernh. к 14 суткам значительно различалась у растений в условиях засоления и контроля. В условиях присутствия хлорида натрия в концентрации 5 г/л всхожесть не превысила 46%, тогда как всхожесть в контроле достигала 80%.

Всхожесть *Betonica officinalis* L. в условиях засоления хлоридом натрия (5 г/л) была значительно снижена в сравнении с контролем.

В условиях засоления семена *Anthemis arvensis* L. постепенно прорастали в течение всего периода наблюдения.

В таблице 1 приведены результаты анализа снижения всхожести семян при концентрации хлорида натрия 5 г/л.

Как свидетельствуют данные таблицы 1, наиболее устойчивыми к засолению с точки зрения всхожести оказались *Achillea millefolium* L., *Centaurea jacea* L. и *Verbascum nigrum* L. Для данных таксонов снижение показателя всхожести не превышало 15% на 14-е сутки эксперимента. *Betonica officinalis* L., *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult и *Galium verum* L. оказались наиболее чувствительными к воздействию хлоридного засоления. *Viscaria vulgaris* Bernh., *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay и *Anthemis arvensis* L. были среднеустойчивыми к засолению в условиях эксперимента.

Таблица 1. – Снижение всхожести при засолении, % к контролю

Таксон	Снижение всхожести, %		
	Содержание хлорида натрия 5г/л		
	4 сутки	8 сутки	14 сутки
<i>Viscaria vulgaris</i> Bernh.	0	42,5	42,5
<i>Centaurea jacea</i> L.	10,5	16,7	7,1
<i>Achillea millefolium</i> L.	8,6	8,6	8,6
<i>Verbascum nigrum</i> L.	12,5	12,5	12,5
<i>Betonica officinalis</i> L.	0	75,0	87,5
<i>Anthemis tinctoria</i> (L.) J.Gay	0	0	26,7
<i>Anthemis arvensis</i> L.	33,3	33,3	33,3
<i>Knautia arvensis</i> (L.) J.M. Coult	-	-	65,4
<i>Galium verum</i> L.	-	-	100

Влияние засоления на морфологические показатели (длину корня и проростка) оценивали на 4, 8 и 14 сутки.

Засоление оказывало значительное влияние на среднюю длину корня *Achillea millefolium* L. На длину проростка *Achillea millefolium* L. засоление не влияло, достоверных различий по этому показателю не выявлено.

Засоление также оказывало влияние на длину корня *Viscaria vulgaris* Bernh., на 8-е сутки средняя длина корней снижалась приблизительно на 25%.

Влияние засоления на длину корня у *Verbascum nigrum* L. усиливалось со временем. Если к 8-м суткам наблюдалось увеличение средней длины корня на фоне засоления, то к 14-м суткам дальнейший рост корня в длину отсутствовал.

Однако наблюдалось увеличение количества придаточных корней, что не наблюдалось в такой степени у контрольных растений.

Для *Anthemis arvensis* L. так же как и для *Verbascum nigrum* L. влияние засоления на длину корня усиливалось со временем.

Для *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay задержка роста корня была наибольшей на первых этапах, к 14 дню средняя длина корня при засолении была сопоставима с контролем.

В таблице 2 представлены обобщенные данные по изменению средней длины корня в присутствии хлорида натрия в концентрации 5 г/л.

Из данных таблицы 2 следует, что в большинстве случаев присутствие хлорида натрия в концентрации 5 г/л снижало среднюю длину корня на 50-60%. Для *Viscaria vulgaris* Bernh. это снижение не превышало 30%. Средняя длина корня *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay на 4 сутки была на 57% ниже, чем в контроле, однако к 14 суткам снижение составило 2,5%.

Влияние засоления на длину проростка было менее выраженным у большинства исследованных таксонов. Для *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay оказалось, что на фоне первоначального снижения этого показателя на 4-е сутки для семян в условиях засоления, к 8-и суткам этот показатель не имел достоверных различий между вариантами, а к 14-и суткам показано достоверное повышение значения этого показателя в сравнении с контролем.

Таблица 2. – Изменение средней длины корня при засолении, % к контролю

Таксон	Снижение средней длины корня, %		
	Содержание хлорида натрия 5г/л		
	4 сутки	8 сутки	14 сутки
<i>Viscaria vulgaris</i> Bernh.	16,7	24,8	29,7
<i>Centaurea jacea</i> L.	65,2	50,4	47,7
<i>Achillea millefolium</i> L.	62,7	67,2	51,1
<i>Verbascum nigrum</i> L.	55,2	57,7	60,6
<i>Anthemis tinctoria</i> (L.) J.Gay	56,9	8,2	2,5
<i>Anthemis arvensis</i> L.	68,9	33,3	59,4
<i>Knautia arvensis</i> (L.) J.M. Coult	-	-	50,8

Для *Centaurea jacea* L. различия в длине проростков к 8-и суткам нивелировались. Также и для других исследованных таксонов не выявлено достоверных различий в средней длине проростка при засолении 5 г/л в сравнении с контролем.

Таким образом, в результате анализа воздействия различных концентраций хлорида натрия на прорастание и морфогенез объектов исследования на свету, можно сделать ряд выводов:

- при засолении хлоридом натрия наблюдалось полное подавление прорастания семян в концентрациях выше 20 г/л у всех изученных видов растений;
- при концентрации 10 г/л полностью отсутствовал рост у таких видов как *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay, *Anthemis arvensis* L., *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult, *Betonica officinalis* L., *Centaurea jacea* L., *Verbascum nigrum* L.;
- при 5 г/л также наблюдалось полное подавление прорастания у *Galium verum* L.;
- наиболее устойчивыми к засолению с точки зрения всхожести оказались *Achillea millefolium* L., *Centaurea jacea* L. и *Verbascum nigrum* L. Для данных таксонов снижение показателя всхожести не превышало 15% к 14 суткам эксперимента;
- *Betonica officinalis* L., *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult и *Galium verum* L. оказались наиболее чувствительными к воздействию хлоридного засоления;
- *Viscaria vulgaris* Bernh., *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay и *Anthemis arvensis* L. были среднеустойчивыми к засолению в условиях эксперимента;
- в большинстве случаев присутствие хлорида натрия в концентрации 5 г/л снижало среднюю длину корня на 50-60%. Для *Viscaria vulgaris* Bernh. это снижение не превышало 30%;
- влияние засоления на длину проростка выявлено у *Anthemis tinctoria* (L.) J.Gay и *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult.

Закключение: при засолении хлоридом натрия наблюдалось полное подавление прорастания семян в концентрациях выше 20 г/л у всех изученных видов растений. Наиболее устойчивыми к засолению с точки зрения всхожести оказались *Achillea millefolium* L., *Centaurea jacea* L. и *Verbascum nigrum* L. *Betonica officinalis* L., *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult и *Galium verum* L. В большинстве случаев присутствие хлорида натрия в концентрации 5 г/л снижало среднюю длину корня на 50-60%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б20РА-018).

#### Список использованных источников

1. Лукашенко: на каждом пяточке в Минске и областях должны быть высажены деревья [Электронный ресурс]. / БЕЛТА. – Минск, 2019. – Режим доступа: <https://www.belta.by/president/view/lukashenko-na-kazhdom-pjatachke-v-minske-i-oblastjah-dolzheny-byt-vysazheny-derevjja-342369-2019>. – Дата доступа 08.10.2019.
2. Влияние остаточных количеств противогололедных материалов на физиолого-биохимические показатели древесно-кустарниковых растений / А.П. Яковлев // Материалы III Международной научной конференции Минск, 22–24 октября 2008 г. С. 172 – 174.
3. Оценка эффективности использования клеточной селекции при создании газонов, растущих в условиях повышенного содержания меди в окружающей среде / Долгих Ю.И., Гладкова О.Н., Глушецкая Л.С. // Известия Московского государственного технического университета МАМИ. – 2014. – V. 4 (22), N 3. – С. 15- 19.

4. Отбор солеустойчивых газонных трав с помощью методов биотехнологии / Е.А.Гладков, Ю.И.Долгих, В.В. Бирюков // Биотехнология. – 2003. – Т 5. - С.11-15.

5. Жесткова, Д.Б. состав и структура травянистого покрова придорожных территорий автомагистралей крупного промышленного города Специальность: 03.02.08 – Экология (биологические науки) Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Н.Новгород, 2016.

УДК 634.635.07

## **СОХРАНЕНИЕ ВОДНЫХ РЕСУРСОВ ПРИ ВНЕДРЕНИИ ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОРОШЕНИЯ**

**В.В. Бойко<sup>1</sup>, С.В. Тыновец<sup>2</sup>, Н.Г. Володько<sup>3</sup>, Д.В. Герасымик<sup>3</sup>, И.В. Тыновец<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ООО «Профполив»

<sup>2</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

<sup>3</sup>ФХ «МатерраАгро»

Для Белорусского Полесья (южная агроклиматическая область) характерно распространение легких по гранулометрическому составу (песчаных и супесчаных) почв. Анализ агроклиматических ресурсов Беларуси и экологических требований позволил предположить, что здесь сложились достаточно благоприятные агроклиматические условия для выращивания многих культур. Главные лимитирующие факторы, которые могут наиболее активно влиять на процесс интродукции, конкретные для каждого из растений устанавливает саму возможность их культивирования в данном интродукционном пункте в любой форме, с использованием любых агротехнических приемов[1-3].

Проблема водных ресурсов и их рационального использования стоит довольно остро во всем мире. В большинстве районов нашей страны колебания урожаев от года к году чаще всего вызваны несоответствием запасов влаги в почве потребностям в ней растений. Специализация сельского хозяйства, структура посевных площадей, подбор сортов, система обработки почвы и удобрений, способы уборки сельскохозяйственных культур, не говоря уже о коренных мероприятиях, орошении, осушении, полесзащитном лесоразведении — вот далеко не полный перечень тех вопросов, решение которых требует учета особенностей водного режима сельскохозяйственных угодий и закономерностей его изменений в зависимости от погоды[4,5].

Влага в корнеобитаемом слое почвы — практически единственный источник водоснабжения растений. Постоянно происходящий обмен влагой между почвой, растением и атмосферой непрерывно меняет содержание почвенной влаги. Поэтому изучение этого жизненно необходимого фактора сводится к изучению режима влаги в почве, определяемого совокупностью процессов поступления ее в почву, изменения физического состояния, передвижения и расходования ее из почвы. Кроме этого, для успешного ведения предпринимательской деятельности в таких отраслях, как ягодоводство или садоводство, необходимо обосновывать использование каждой капли и внедрять современные технологии, способные обеспечить не только производство конкурентоспособных, экологически безопасных плодов и ягод, но и быструю окупаемость затрат и высокую производительность. Почвенная влага — это ресурсы для построения тела растений и это один из основных факторов, определяющих условия существования сельскохозяйственных культур и обработки почвы. Процесс фотосинтеза ограничен не количеством солнечной энергии, а количеством воды[2,3,6,7].

В связи с этим рациональное использование воды является основной проблемой при выращивании плодово-ягодной продукции. Определение совокупности количества, сроков и норм поливов необходимо для разработки проектного и эксплуатационного режимов орошения для почвенно-климатических условий Припятского Полесья.

Комплексный подход к вопросу орошения и организации этого процесса в целом (от проектирования, до реализации проекта «под ключ»), а также предоставление комплекса услуг по монтажу и сервисному обслуживанию всего оборудования, проведение функциональной диагностики растений способствует стимуляции ускоренного роста и развития растений, обеспечивается возможность поддерживать влажность почвы или субстрата на постоянном уровне или в оптимальных для растения пределах, с необходимым количественным составом элементов питания необходимых для растений в различные периоды роста и развития.

Капельное орошение – необходимый элемент для правильного и грамотного выращивания урожая. Даже посадочный материал уже генетически выведен с учетом того, что у него должны быть определенные нормы полива.

Исследования проведенные в ФХ «Синия Птица» и «МатэрраАгро» показали, что при автоматизации полива и точных системах фертигации, с контролем показателей ЕС и pH, а также в удаленном управлении полива через Интернет с ПК или смартфона позволяет обеспечить:

1. Экономии расходования воды на полив растений голубики высокорослой не менее чем на 20%.
2. Экономии удельных капитальных вложений в строительство оросительных систем и их эксплуатацию на 3–5%.
3. Стабильное, ежегодное повышение урожайности ягод голубики высокорослой не менее чем в 10%
4. В сравнение с ручными системами полива автоматика позволяет экономить до 20-25% систем питания и защиты растений.

Внедрение научно-технических разработок, разумные инновационные системы, позволяющие абсолютно точно контролировать и мониторить все процессы полива и питания растений, кроме этого, программное обеспечение автоматизированных систем полива позволяет подключиться к метеостанции и синхронизировать все процессы в один узел в виде удобных графиков и таблиц. С помощью специальных программ агроном или руководитель хозяйства на экране планшета или телефона может видеть все процессы полива, внесения удобрений и других необходимых процессов. Автоматические системы позволяют контролировать и вести аналитику погоды и прогнозировать своевременный полив растений. На основе этой аналитики можно выстраивать грамотные технологические карты именно для своего хозяйства, на своей территории, на своих почвах с учетом малейших факторов, которые могут повлиять на рост и развитие растений.

Необходимые параметры полива и питания растений дает возможность производителю обеспечить не только жизнеспособность своего сада или плантации, но и влияет на качество урожая, а в будущем – на доходы от него. Вкусный, красивый и качественный фрукт или ягода всегда будет востребована по лучшим ценам.

#### **Список использованных источников**

1. Проблемы и перспективы развития органического земледелия в Припятском Полесье Республики Беларусь / П. М. Скрипчук, С.В. Тыновец, В.С. Филипенко, И.В. Тыновец // Збалансоване природокористування : науково-практичний журнал. – 2018. – № 3. – С. 40-49.
2. Почвенная влага / С.А. Вериго, Л.А. Разумова. – Ленинград: Гидрометеиздат, 1973.- 328с.
3. Выращивание органических ягодных культур: монография / Л. Е. Совик [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2019. – 276 с.
4. Рекомендации по производству органических ягод в трансграничных районах Украины и Беларуси (с учетом требований стандартов ЕС): справочное пособие / Л. Е. Совик [и др.]. – Минск: Мисанта, 2018. – 262 с.
5. Тыновец, С.В. Переход от традиционного к органическому производству ягодных культур / С. В. Тыновец, В. С. Филипенко, Л. Е. Совик // Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы: сборник трудов XIII международной научно-практической конференции, Пинск, Республика Беларусь, 26 апреля 2019 г. – Пинск: ПолесГУ, 2019. – С. 112-114
6. Тыновец, С.В. Определение потребности голубики высокорослой в элементах питания (НРК) балансовым методом при выращивании по органическим технологиям / С.В. Тыновец, В.С. Филипенко // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сборник научных статей по материалам XXIII Международной научно-практической конференции, Гродно, 23 апреля, 24 марта, 5 июня 2020 года / Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет»; ответственный за выпуск О. В. Вертинская. – Гродно : ГГАУ, 2020. – Агрономия. Защита растений. Технология хранения и переработки сельскохозяйственной продукции. – С. 163-165.
7. Филипенко, В. С. Экологическая и экономическая оценка органического производства ягод в трансграничных районах / А. Г. Король, В. С. Филипенко, С. В. Тыновец // Актуальные проблемы инновационного развития агропромышленного комплекса Беларуси : материалы X-й Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию экономического факультета, Горки, 18-19 октября 2018 г.: в 2 ч. / редкол.: И. В. Шафранская (отв. ред.) [и др.]. - Горки : БГСХА, 2019. - Ч. 2. - С. 241-246.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ РОСТА РАСТЕНИЙ

**А.В. Воронич, В.Н. Штепа, С.В. Тыновец**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

С каждым годом возрастают требования к повышению экономической эффективности применения органических минеральных удобрений. Для того чтобы выбрать и внедрить эффективные варианты применения удобрений, нужна их производственная проверка, а также экономическая оценка [1, 2].

На рост и развитие растений влияет шесть факторов: питание, водоснабжение, освещение, кислород и CO<sub>2</sub>. При использовании в качестве удобрения ВБАС, мы можем влиять на три фактора из шести: питание, водоснабжение и наличие кислорода в почве. ВБАС повышает коэффициент структурности почвы, увеличивает капиллярную влагоемкость и структуру почвы, тем самым значительно влияет на рост и развитие растения [3].

Основной целью сельского и лесного хозяйств XXI века является экологизация агро производства на фоне глобального загрязнения почвы большим количеством техногенных и радиационных веществ, а также перегрузки почв удобрениями. Использование удобрений на основе высокомолекулярных биологически активных веществ является приоритетным для данных отраслей: они улучшают качество почвы, интенсификацию роста растений и понижают содержание радиационных веществ [4].

Целью данной работы внедрение комбинаторной химической технологии получения на основе высокомолекулярных биологически активных соединений применения для интенсификации технологических процессов в сельском хозяйстве.

Исследования проводились в отраслевой лаборатории «Инновационные технологии в агропромышленном комплексе» УО "Полесский государственный университет".

Семена салата листового, сорт Бионда Триест ранний высевались в торфяную смесь ОАО «Торфопредприятие Глинка» для определения качественных характеристик при прорастании семян и роста растений. Эксперимент проводили в 4 вариантах при трехкратной повторности, с изменением концентрации высокомолекулярного биологически активного вещества в растворе.

- 1) 1 мл/л ВБАС «Volavela» в растворе;
- 2) 4 мл/л ВБАС «Volavela» в растворе;
- 3) 10 мл/л ВБАС «Volavela» в растворе.
- 4) Контроль, 0 мл/л ВБАС «Volavela» в растворе.

После посева семян был произведен обильный полив и накрытие кассет с семенами плёнкой, для скорейшего прорастания семян. После прорастания семян, пленка была снята и полив осуществляли через каждые 3 суток. Полученные данные приведены в таблице 1.

Для определения обеззараживающего действия ВБАС были взяты 2 пробы воды, без добавления ВБАС и с добавлением ВБАС, Из десятикратного разведения разведения делали посев 0,5 мл на КМАФАнМ среду. Посевы выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 2 суток (Рисунок).

Таблица 1. – Прорастание семян салата листового при поливе растворами ВБАС «VOLAVELA»

Концентрация биоцида в воде, мл/л	День прорастания семян
0	7
1	3
4	4
10	5

На 12 день был сделан контрольный замер высоты растений. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Высота растения салата листового при поливе растворами биоцида на 12 день

Концентрация биоцида в воде, мл/л	Высота растения, см
0	2-3,5
1	8,5-9
4	7,5-8
10	5-6,5



**Рисунок – Пробы исходная вода (слева) и ВБАС «VOLAVELA», (справа), высаженные на среду КМАФAnM**

В чашке, в которую был осуществлён посев исходной воды был обнаружен сплошной рост, что свидетельствует о высоком содержании микроорганизмов. На чашке с пробой воды, обработанной ВБАС «VOLAVELA», ни одной колонии обнаружено не было. Это можно объяснить тем, что ВБАС «VOLAVELA» обладает высоким обеззараживающим действием.

На основе полученных данных, можно сделать выводы о действии комплекса ВБАС «VOLAVELA» + торф.

**Выводы.**

1. Применение биоцида повышает всхожесть семян и ускоряет рост биомассы растения в несколько раз, в зависимости от концентрации биоцида в растворе, используемого для полива.
2. Наиболее результативной концентрацией ВБАС в растворе является 1 мл/л, при которой время прорастания семян увеличивается в более чем два раза. А скорость роста растения на ранних стадиях может превышать в 4 раза.
3. Рекомендуется использовать концентрации биоцида в растворе от 1 до 5 мл/л. Максимальная эффективность наблюдается именно в этом диапазоне
4. ВБАС позволяет создать экологическую и биологическую чистоту посевного материала и выращенного урожая за счет уничтожения патогенного фона.
5. ВБАС позволяет обеспечить рациональное применение минеральных удобрений, за счет снижения норм внесения до 30% при использовании полимеров, создания новых высокоэффективных видов удобрений с применением полимеров;

#### **Список использованных источников**

1. Лабораторные работы по практической экологии: Методические указания к лабораторным работам по дисциплине «Практическая экология» Павлова, Е.В. Шаповалова. – Омск: Изд-во СиБАДИ, 2008. – 32 с.
2. Патент РФ № 77.99.88.002.Е.002747.08.2020
3. Трунов Ю. В., Седых А. В., Трунова Л. Б., Каширская О. В. Повышение качества и эффективности выращивания саженцев яблони при некорневых подкормках удобрениями // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – с. 26-28.

4. Цуканова Е. М., Каширская Н. Я., Ткачѳв Е. Н., Скрылѳв А. А., Пчелинцева Л. А. Эффективность применения некоторых элементов технологии с учетом диагностики функционального состояния плодовых растений// Достижения науки и техники АПК. – 2009. – с. 22-24.

УДК 633.11

## **ФОРМИРОВАНИЕ УРОЖАЙНОСТИ И КАЧЕСТВА ЗЕРНА ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ В СЕВЕРНОЙ СТЕПИ УКРАИНЫ**

**И.И. Гасанова**

*Институт зерновых культур НААН Украины, Днепр, gasanova@ua.fm*

Результаты научных исследований и производственный опыт свидетельствуют о наличии неиспользованных резервов для повышения сборов высококачественного зерна озимой пшеницы в условиях северной Степи Украины независимо от погоды на протяжении вегетационного периода. И, первое, это внедрение зональных технологий выращивания, разработанных с учетом почвенно-климатических условий, предшественников, биологических особенностей новых сортов, а также экономических возможностей различных сельскохозяйственных предприятий.

Озимая пшеница – это культура, которая очень отзывчивая на улучшение минерального питания растений во время их роста и развития. Удобрения – один из наиболее действенных факторов повышения не только урожайности озимой пшеницы, но и качества ее зерна [1, 2]. Вместе с тем наблюдается значительное повышение цен на распространенные виды удобрений, которые применяются в основное внесение и в подкормку (нитроаммофоска, аммиачная селитра, КАС, карбамид и др.). Возрастает стоимость и средств защиты посевов от болезней, вредителей и сорняков. Поэтому не все хозяйства могут себе позволить применение повышенных доз удобрений и обеспечить защиту посевов озимой пшеницы в разные фазы развития растений. Вместе с неоспоримым значением минеральных удобрений в формировании урожайности и качества зерна озимой пшеницы, следует иметь в виду, что они, а также интенсивная защита растений могут быть причиной накопления потенциально опасных вредных веществ в верхних горизонтах почвы, а также способствовать их миграции по почвенному профилю вниз и создавать потенциальную опасность загрязнения почвенных вод [3]. Напротив, использование экологически безопасных систем удобрения в поле озимой пшеницы обеспечивает оптимальный режим нитрификационных процессов в почве и способствует повышению содержания лабильных органических соединений [4]. Поэтому с экономической точки зрения и с позиции уменьшения нанесения вреда окружающей среде разумным является научно обоснованная, рациональная система применения химических веществ при выращивании озимой пшеницы.

В контексте ресурсосбережения при выращивании озимой пшеницы следует также выделить роль срока посева, как приема агротехники, не требующего дополнительных материальных затрат. И особое значение оптимизация сроков посева этой культуры приобретает в условиях изменений климата в сторону глобального потепления. Многолетние экспериментальные данные, полученные в Институте зерновых культур на различных опытных станциях, указывают на значительное влияние срока посева на рост и развитие растений озимой пшеницы и формирование ее продуктивности. В последние годы в Украине сроки посева смещаются в сторону поздних: по сравнению с 50-ми годами прошлого столетия – на 30 дней; 70-ми – 20; 80-ми – 15–20; 90-ми – на 10 дней. В настоящее время в условиях северной Степи оптимальные климатические условия для посева создаются в период с 15 по 30 сентября. Слишком ранний посев приводит к усиленному кущению озимой пшеницы, слишком поздний негативно влияет на ростовые процессы, фенологию пшеницы, что способствует распространению сорняков. Как посева ранних, так и поздних сроков посева, имеют пониженную зимо- и морозостойкость [5].

При определении доз и сроков внесения азотных удобрений для экономии ресурсов целесообразным является проведение почвенной и растительной диагностики. Почвенная диагностика азотного питания растений озимой пшеницы должна быть направлена на уточнение доз внесения азота до посева и в подкормки в весенне-летний период вегетации. Если суммарное содержание азота в 60 см шаре почвы на посевах озими в фазе весеннего кущения составляет до 15 мг/кг – это низкие запасы элемента, в пределах 16–24 мг/кг – средние, 25–30 мг/кг – повышенные, а более 30 мг/кг – высокие. В случае низкого содержания азота в почве на посева следует вносить не менее

45–60 кг/га д.в. этого элемента, среднего – до 30 кг/га, при повышенном и высоком уровне обеспечения – подкормки не проводят. Растительная диагностика должна дополнять почвенную. Она позволяет своевременно скорректировать уровень азотного питания растений озимой пшеницы во время их вегетации [6, 7].

В рамках ресурсосберегательной технологии выращивания озимой пшеницы рекомендуется более взвешенно подходить к определению рациональной нормы высева, так как семена с каждым годом дорожают. Примеры из научных и производственных опытов показывают, что уменьшение нормы высева семян озимых зерновых культур зачастую не приводит к снижению урожая зерна. Это происходит за счет лучшей кустистости растений на площадях с невысокой нормой высева. Но для сортов различного происхождения и типа использования, с неодинаковыми биологическими особенностями, оптимальная норма высева семян может быть разной. По мнению ученых и аграриев рациональное, научно-обоснованное снижение нормы высева семян в современных условиях также будет способствовать экономии материальных затрат в хозяйствах.

В условиях северной Степи Украины в Государственном учреждении «Институт зерновых культур НААН Украины» на протяжении последних 14 лет проводили полевые опыты с озимой пшеницей с использованием различных по своему ресурсному обеспечению технологий выращивания. Опыты располагали после паровых предшественников (черный и занятый пар), а также после таких непаровых, как зернобобовые культуры, зерновые колосовые, озимый рапс, подсолнечник. Ресурсосберегающая технология выращивания предполагала протравливание семян перед посевом, а также, основываясь на результатах почвенной диагностики, после паровых предшественников предпосевное внесение фосфорно-калийных удобрений –  $P_{30}K_{30}$ , после непаровых фон минерального питания составлял  $N_{30-45}P_{30}K_{30}$ , и кроме этого, после всех предшественников проводили ранневесеннюю подкормку  $N_{30}$  по мерзлоталой почве (МТП) и защиту посевов от болезней, вредителей и сорняков при превышении экономического порога вредоносности. Интенсивная технология выращивания, более затратная, включала сочетание более высокого агрофона ( $N_{30}P_{60}K_{30}$  по паровым,  $N_{45-90}P_{60}K_{60}$  – после непаровых предшественников), весенние (по МТП и в конце кущения растений) азотные подкормки посевов дозами  $N_{30-60}$  и проведение полного защитного комплекса от болезней, вредителей и сорняков.

Исходя из полученных результатов исследований, при ресурсосберегающей технологии выращивания по паровым предшественникам урожайность озимой пшеницы была, в основном, в пределах 4,2–6,0 т/га, после непаровых – 2,8–4,5 т/га. Содержание белка в зерне по паровым предшественникам колебалось от 11,5 до 13,0%, сырой клейковины – от 21,5 до 25,0%; после непаровых эти показатели качества зерна составляли 9,0–11,5 и 18,0–22,0% соответственно. То есть, согласно действующему национальному стандарту на пшеницу по паровым предшественникам при ресурсосберегающей технологии выращивания формировалось продовольственное зерно второго и третьего класса качества, после непаровых – третьего и четвертого класса. Следует заметить, что зерно пшеницы четвертого класса преимущественно используется на кормовые цели. В годы исследований лучшие показатели урожайности и качества зерна среди непаровых предшественников получали после зернобобовых культур.

Установлено, что при применении интенсивной технологии выращивания наблюдали более высокие уровни урожайности озимой пшеницы, повышались и показатели качества зерна. Но эффективность применения той или иной технологии выращивания определяется не только уровнем урожайности и качества зерна, но и экономическими показателями – себестоимостью полученной продукции, рентабельностью производства и другими. При проведении экономических расчетов учитываются рыночные цены на сельскохозяйственную продукцию с одной стороны и смазочно-топливные материалы, удобрения, средства защиты растений от вредных организмов – с другой. На основании таких расчетов выявлено, что при интенсивной технологии выращивания озимой пшеницы вместе с повышением производственных затрат во многих случаях повышалась и себестоимость 1 тонны зерна. По паровым предшественникам уровень рентабельности при применении интенсивной технологии в сравнении с ресурсосберегающей во многих случаях снижался; после непаровых, где посе́вы пшеницы были более отзывчивые на внесение удобрений, рентабельность, в основном, повышалась. То есть, анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что ресурсосберегающая технология выращивания озимой пшеницы более эффективна после лучших предшественников, где содержание влаги и питательных веществ в почве изначально выше.

Эффективность ресурсосберегающей технологии выращивания озимой пшеницы можно повысить, учитывая такой фактор, как выбор сортов, пластичных к срокам посева, предшественникам.

Главными требованиями к таким сортам является устойчивость растений к неблагоприятным стрессовым абиотическим факторам окружающей среды, высокие генетически обусловленные технологические свойства зерна и продуктов его переработки. Согласно исследованиям, проведенным в последние годы в сети опытных станций ГУ «Институт зерновых культур НААН», расположенных в различных частях зоны Степи, лучшее качество зерна отмечается у отечественных сортов Пылпыпка, Нива одесская, Журавка, Мудрость одесская, Лада одесская, Апогей Луганский, Сонечко. Все эти сорта при применении надлежащей технологии выращивания формируют зерно с содержанием белка не менее 12–13%, сырой клейковины – 23,5–25,0%. При выборе сорта следует принимать во внимание предшественник, питательный режим почвы. По паровым предшественникам и на более интенсивных фонах следует отдавать предпочтение сортам, не склонным к полеганию. Проведенные в Институте зерновых культур в условиях северной Степи на протяжении 2008–2021 гг. наблюдения позволили выявить перечень таких сортов – это Коханка, Фаворитка, Фермерка, Альянс, Вдала, Землячка одесская, Миссия одесская.

При выборе сорта следует учитывать также его склонность к прорастанию в колосе на стебле. У проросших зерен снижаются такие показатели качества, как масса 1000 зерен, стекловидность, натура, число падения, хлебопекарные свойства. Анализ образцов зерна разных сортов озимой пшеницы показал, что при запаздывании с уборкой в случае влажной погоды наибольшее количество проросших зерен выявляли в образцах сортов Скарбница, Пошана, Сонечко, Апогей Луганский. В то же время наиболее стойкими к прорастанию зерна в колосе оказывались сорта украинской селекции Зира, Фаворитка, Золотоколосая, Куяльник, Заможність, Антонивка, а также российской – Краснодарская 99, Есаул, Память, Юбилейная 100. У этих сортов часть проросших зерен составляла менее 2%, что не влияло на показатели качества.

#### Список использованных источников

1. Минеев В. Г., Павлов А. Н. Агротехнические основы повышения качества зерна пшеницы. Москва: Колос, 1981. 289 с.
2. Николаев Е. В. Технология выращивания сильной озимой пшеницы. Симферополь: Таврия, 1986. 96 с.
3. Тогагинська О. В., Парашенко І. В. Екологічна експертиза технологій вирощування пшениці озимої в умовах Північного Лісостепу. Вісник Полтавської державної аграрної академії, 2018. № 2. С. 40–44.
4. Седіло Г. М., Дубицька А. О., Качмар О. Й., Вавринович О. В., Дубицький О. Л. Родючість ґрунту під пшеницею озимою за екологічно безпечних систем удобрення. Вісник аграрної науки, 2018. № 12. С. 19–25.
5. Черенков А. В., Нестерець В. Г., Солодушко М. М., Гасанова І. І. та ін. Пшениця озима в зоні Степу, кліматичні зміни та технології вирощування. Дніпропетровськ: Нова ідеологія, 2015. 548 с.
6. Оптимізація доз застосування азотних добрив на основі рослинної і ґрунтової діагностики живлення рослин: метод. рекомендації / за ред. А. Я. Буки. Харків, 2000. 32 с.
7. Церлинг В. В. Агротехнические основы диагностики минерального питания сельскохозяйственных культур. М.: Наука, 1978. 216 с.

УДК 628.477(510)

#### FEATURES OF GARBAGE RECYCLING IN NANTUN, JIANGSU PROVINCE, CHINA

Li Xiaolong<sup>1</sup>, V. Lemiasheuski<sup>1,2</sup>, Mehmet Musa Özcan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk

<sup>2</sup>All-Russian research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Borovsk, Russia

<sup>3</sup>Selcuk University, Konya, Turkey  
lem@iseu.by

The composition and harm of rubbish from Nantong, Jiangsu Province, China, summarized the nantong traditional processing method of garbage and industrial power generation method and its related technology, combined with actual examples in nantong implements classified collection, garbage disposal and recycling, so as to realize the reduction and recycling of waste treatment.

*Keywords:* Nantong municipal garbage, recycling, utilization, resources, pollution.

The composition and harm of rubbish from the China in nantong, Jiangsu province, summarized the nantong traditional processing method of garbage and industrial power generation method and its related technology, combined with actual examples in nantong implements classified collection, garbage disposal and recycling, so as to realize the reduction and recycling of waste treatment.

The purpose of the research. Nantong's garbage is of great value and provides many jobs. Due to the lack of industrial policies for garbage recycling in Nantong city, garbage disposal has not formed an industrial scale. Therefore, according to the economic strength of Nantong city, it is necessary to carry out classified collection, harmless treatment and recycling of garbage, turn waste into treasure, and realize the reduction and recycling of garbage treatment. From the original mechanism and management system to seek a breakthrough, let the garbage treatment into the market operation mode. Attract and support private enterprises and capital to participate in urban waste treatment from the perspective of industrial policy, taxation and finance.

Field investigation was used research results: according to the field investigation in nantong, waste composition and harm of mainly includes the following 3 kinds:

1.1 the living garbage, including waste paper, plastic, glass, metal and organic waste, including packaging and occupied the main part of food waste in the kitchen.

1.2 construction waste and clean up garbage, including soil, stones and concrete blocks, the blocks, waste wood, waste such as pipelines, sweepings public bins in the waste, public places and pavement damage after waste, etc.

1.3 electronic waste and medical waste, including waste electrical appliances, electrical waste, batteries, fluorescent tubes, such as thermometer, hospital contain viruses, bacteria or chemicals of medical waste, inflammable and explosive items and special industry waste containing radioactive substances. This kind of garbage generally cannot be mixed with ordinary garbage.

The garbage investigated above mainly refers to the solid wastes generated by urban residents, excluding the solid wastes generated in industrial and agricultural production activities.

The amount of garbage per person in Nantong city is 1-2 kg per day, and its composition is related to residents' material living standard, habits, recycling degree of waste materials and municipal construction. Direct dumping and simple landfill are many municipal waste treatment methods, the level of harmless treatment is very low, this treatment method will produce a series of serious environmental problems; Aggravate environmental pollution, soil, groundwater, atmosphere will cause realistic impact and potential danger, seriously harm nantong city environment and residents' living conditions. Leachate from natural landfills, in particular, has led to serious water pollution in some areas because it has not been collected and treated as necessary. Even more, landfill or landfill methane explosion and long-term spontaneous combustion phenomenon.

In fact, people are throwing away a lot of recyclables every day. According to the statistics of Nantong Environmental Protection Foundation, there are 362,000 tons of waste plastic in nantong city's annual garbage, and 1 ton of waste plastic can produce 0.37 to 0.73 tons of oil, and every 1 ton of plastic recycled beverage bottles can gain 8 000 yuan of profit. There are 388,000 tons of waste paper, every 1 ton of waste paper can be recycled, 0.85 tons of good paper, save 3 m<sup>3</sup> of wood, It can save 300 kg of alkali and reduce 74 % of pollution compared with the production of good paper. There are 150 thousand tons of waste glass. It can save 10-30 % of energy by reproducing glass from broken glass, reduce 20 % of air pollution and 80 % of abandoned slag from mining. There are 237 million waste batteries, using waste batteries can recover cadmium, nickel, manganese, zinc and other precious heavy metals, while reducing the pollution of heavy metals to the environment and harm to human health. There are 35 thousand tons of scrap metal. For every 1 ton of scrap steel recovered, 0.9 tons of steel can be refined, which can reduce 75 % air pollution, 9.7 % water pollution and solid waste, and save 47 % smelting cost compared with making steel with ore. There are 1.23 million tons of waste food and vegetation. Every 1 ton of waste can produce 0.6 tons of organic fertilizer and waste fuel for power generation and heating. According to the prediction of experts from the Emerging Forecast Council of Developed Countries, 10 emerging technologies will emerge in the fields of energy, environment, agriculture and medicine in the next 10 years, among which the emerging technologies related to waste treatment will be ranked second, and the waste treatment industry will become a new economic growth point in the 21st century.

The traditional garbage treatment methods in Nantong city mainly include landfill, composting and incineration. The three methods are relatively simple in technology, low resource recovery rate and secondary contamination:

2.1 landfill: landfills in less investment, large quantity and technical requirements is not high, covers an area of large, permanent pollution caused by the great potentials. In developed countries, landfill pollution has occurred after decades.

2.2 compost: by waste composting treatment, can make the waste into organic fertilizer. But the fertilizer effect of this kind of garbage fertilizer is low, sale is limited, development leeway is not big.

2.3 burning, burning garbage has the advantage that the recovery of heat energy and the most thorough reducing trash (after burning garbage volume decreased by 80-95 %), but this way is expensive. The construction of an incinerator with a capacity of 1 000 tons of waste per day and its attached thermal energy recovery equipment will cost about \$100 million to \$120 million. Incineration if not well controlled, will produce! Dichalky substances, causing serious air pollution.

At present, there are three main industrial methods of garbage recycling, namely landfill composition! Biogas field electricity, waste incineration recycling heat power generation and through biological engineering technology, so that waste into fertilizer. Either way, there are endless opportunities.

Biogas field power generation, is the current technology mature, less investment, low cost, easy to use and management, favored by developed countries a way of urban waste treatment. By the end of the 20th century, there were more than 140 around the world! The waste gas field power station is in operation. The UK has a capacity to generate 18MW of electricity from waste biogas fields. The landfill biogas plant in Illinois, USA, covers 61 hm<sup>2</sup>, fills 1.8 million tons of waste, and has a generating capacity of 1 600 kW, equivalent to using 28 thousand barrels of oil per year.

The establishment of waste incineration plant, in the incineration process to recover its heat energy, and used for power generation, can realize waste incineration energy. Germany and the United States were the first countries to generate electricity by recycling heat from burning waste. In the 1960s, incinerators were established in the former West Germany, benefiting 2.45 million people. By the 1980s, electricity had been provided to 21.2 million people, accounting for 34.4 % of the total beneficiaries. The United States had invested in incineration plants since the 1980s, with an annual capacity of 30 million tons of waste. In the 1990s incineration accounted for 18 % of America's total waste disposal. The city of Detroit in the United States has the world's largest garbage processing power plant of 4 000 tons per day. Japan's largest waste thermal power plant has a maximum capacity of 22 MW.

Bioengineering treatment methods are low investment, high efficiency and safe. Bioengineering technology is to make use of the microorganism's rapid metabolism and efficient fermentation to transform all the decomposed organic matter in the waste into a stable state of efficient bio-organic fertilizer in a short time. Organic matter that can be decomposed in garbage includes leftover food, rotten vegetable leaves, paper, wood, coal ash, feces, feathers, slaughterhouse waste, etc. Chinese experts on the biological engineering technology treatment of economic analysis, the use of waste to produce 1 t of efficient organic fertilizer cost of about \$50.65. Based on current market conditions, a plant that processes 600 tons of garbage a day and produces 300 tons of finished fertilizer a day can make an annual profit of \$4.03 million.

To sum up, the landfill and incineration compost treatment of nantong municipal solid waste have their own advantages, but also have unavoidable disadvantages. The solution is to use mineral processing technology and equipment to recycle most of the useful substances (50-80 %) after the household waste is classified and collected, and then send the remaining parts that cannot be recycled (50-20 %) to landfill, incineration or composting. In this way, the municipal solid waste can be harmless, reduced and re-resource, and save a lot of money.

УДК 502.3:504.5(510)

## URBAN AIR POLLUTION IN HEBEI, CHINA

**Liu Jiu 'an<sup>1</sup>, V. Lemiasheuski<sup>1,2</sup>, K. Ostrenko<sup>1,2</sup>, A. Ovcharova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*All-Russian research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst,*

*Borovsk, Russia*

*E-mail: lem@iseu.by*

From the end of the 20th century to the beginning of the 21st century, China has entered the process of large-scale urbanization and industrialization, accompanied by this process, environmental pollution problems also appeared, among which the air pollution problem in Hebei province is particularly serious.

This paper analyzes the causes of urban air pollution in Hebei province, expounds the harm of air pollution, and Take measures to control air pollution in Hebei province based on the experience of other areas.

*Keywords:* air pollution control, Hebei province, industrialization

Since the 21st century, China entered the stage of high-speed urbanization, industrialization development, has created a huge economic and social benefits, but also produced a serious ecological environment problems, such as frequent fog weather, inconvenient to people's production and life, health, Hebei province is the most serious pollution provinces in China, Air pollution there is even serious.

Hebei's 11 prefecture-level cities, with the exception of Zhangjiakou, Chengde and Qinhuangdao, are heavily polluted. In the air quality ranking list of 74 major cities in China, most of the 10 cities with the worst air pollution are in Hebei province [1]. Hebei is still the most polluted province in China. The study of air pollution in Hebei province is of typical significance for understanding air pollution in China.

The purpose of this study is to provide the methods to improve the air quality of Hebei province by analyzing the causes of pollution in Hebei province and drawing on the good experience of other regions.

**Analysis of reason of air pollution.** The air pollution in Hebei province is mainly soot pollution caused by coal for industry and heating. The main reasons are as follows:

*Natural factors make the Beijing-Tianjin-Hebei region easy to accumulate pollutants.* In terms of topography, Yanshan Mountain in the north and Taihang Mountain in the west encircle the area. The terrain is high in the northwest and low in the southeast, making it easy for pollutants to gather. From the perspective of climate, the prevailing northwest wind in winter, due to the mountain barrier, when the wind is small, the pollutants are not easy to diffuse. The prevailing southeasterly wind in summer diffused the pollutants in Tangshan, Langfang and other places to the whole region, and locked the pollutants in the Yanshan-Taihang Mountain range. Therefore, the interaction between topographic and climatic conditions is an important reason for the difficult diffusion of pollutants in this area.

*Industrial structure overly dependent on steel industry and other heavy industries.* The industrial structure of Hebei province is a heavy chemical industry system dominated by the secondary industry and led by the steel industry. Iron and steel, cement, glass, petrochemical, thermal power generation and leather are all key industries in Hebei Province, but these industries have high energy consumption and large pollutant discharge per unit output. By the end of 2014, there are 110 iron and steel production enterprises and 348 blast furnaces in the province, with an annual capacity of 269 million tons of iron. There are 305 bessaries and electric furnaces, with an annual capacity of 261 million tons [2].

*Cars account for a significant proportion of the means of transportation.* The proportion of highway freight in Hebei is high, and the contribution of NO<sub>x</sub> emission from motor vehicles is outstanding. In particular, diesel truck emissions accounting for less than 10 % of the vehicle ownership account for 70 % of the total vehicle emissions. Of the freight vehicles crossing the border, nearly two-thirds are heavy-duty diesel vehicles.

**Countermeasures against air pollution.** In order to prevent the worsening of air pollution, the state has issued a series of laws and regulations to control air pollution. Beijing is located in the core area of the Beijing-Tianjin-Hebei region. In order to improve the environment, Beijing adheres to the strategy of clean energy, vigorously promotes the reduction of coal burning in industry and daily life, and strives to build a clean energy system dominated by electricity and natural gas, supplemented by geothermal energy and solar energy. On the one hand, four gas-fired heat and power centers have been built, basically eliminating coal-fired boilers of 10 tons or less in the city and 35 tons or less in the built-up area, and realizing basically no coal burning in the industrial field. On the other hand, we intensified efforts to control loose coal, and vigorously implemented "coal to electricity" and "coal to gas". The total amount of coal burned in the city decreased from 23 million tons in 2012 to less than 6 million tons in 2017. Through the adjustment of energy structure, Beijing's air quality and air pollutant emissions have been significantly reduced [3].

Drawing on the successful experience of Beijing, Hebei should adopt the following measures to achieve the goal of achieving the emission of air pollutants from the standard to ultra-low emission and then to the overall ultra-low emission.

First of all, in the construction of urban industrialization, the use of advanced industrial technology, can effectively control the emission of industrial waste gas, reduce the pollution of waste gas to the environment. While continuing efforts to desulphurize, sell off coal and remove dust from key industrial enterprises and pollution sources, we will also introduce these measures into non-key areas so as to reduce overall emissions and intensity of air pollutants. Secondly, the emission standards of air pollutants in different industries will be improved so that all industrial sectors will comply with the emission standards,

non-industrial production sectors will gradually comply with the emission standards, and key industrial enterprises will implement ultra-low emission of air pollutants. We will promote the issuance of pollutant discharge permits to all industries and gradually close down industrial enterprises that fail to meet pollutant discharge standards. According to the investigation and study, found that adopt the way of power, hydropower, wind production can reduce industrial emissions, in the actual production process, we can reasonably use power and water, wind, the mode of production in today's industrial production, the most is fire production, carbon dioxide, sulfur dioxide emissions from the burning of a lot of, This approach is not conducive to China's environmental protection, so we should continue to vigorously develop clean energy such as water and wind, reduce industrial waste gas emissions.

Second, the implementation of regional collaborative governance in Hebei Province. Because air pollution can flow and spread, only coordinated governance, to achieve effective prevention and control. In implementing coordinated regional prevention and control, we should not only fully respect each region's right to development, but also respect each region's contribution to air pollution prevention and control. We can set up air pollution prevention and control organizations in prefecture-level cities to eliminate the estrangement between various departments, and set up multi-department consultation mechanism to realize multi-department collaborative governance, and bring the contribution of departments to air pollution prevention and control into the assessment system of urban development.

Hebei province, due to the serious emission of industrial exhaust gas, automobile exhaust emissions lead to a serious decline in ambient air quality, to people's health posed a threat. If you want to improve our air quality, we should start from now, and set up the consciousness of environmental protection, consciously to reduce waste emissions in the life, reduce industrial gases and car exhaust emissions, reasonable use of resources, development of more advanced technology to promote improvement of environmental air quality achieve the better effect of environmental air quality control.

#### References

1. Jia Shibin, Yin Chengyuan, Green Finance Countermeasures of Air Pollution Control in Hebei Province from the perspective of Industrial Structure Adjustment, Hebei Finance 2020. – P.110.
2. Lu Yixian, The Inner relationship between Air Pollution in Beijing-Tianjin-Hebei region and Industrial Structure in Hebei Province – Also on joint Control Measures, Journal of Tianjin University of Commerce, March 2016, Vol. 36, No. 2, 25-30.
3. Zheng Linchang. Green Paper on Low-carbon and Environmental Protection Development – Collaborative Assessment of Low-carbon, Environmental protection and Development in China (2005-2017) [M]. Beijing: People's Publishing House, 2019.

УДК 628.3:502.51(510)

#### PROBLEMS OF CONTROL OF STORMWATER RUNOFF POLLUTION IN ZHANGJIAKOU CITY, HEBI REGION

Liu Zhi gang<sup>1</sup>, K. Ostrenko<sup>1,2</sup>, A. Ovcharova<sup>2</sup>, V. Lemiasheuski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk

<sup>2</sup>All-Russian research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Borovsk, Russia

lem@iseu.by, niu5151@126.com

Refer to the technical means of water quality management at home and abroad; use the concept of maximum daily load (TMDL) to govern the river water environment in Zhangjiakou City, Hebei Province; use total phosphorus as a representative indicator of river eutrophication as a water quality evaluation factor; sort out the drainage network, Current status of discharge and non-point source pollution; use Zhangjiakou river environment model coupling calculation method; scientifically formulate total phosphorus emission control plan; simulation calculation; control the discharge flow of the discharge outlet; the total phosphorus pollution load to be discharged into the river Cut 2.33t/a; it can effectively achieve the water environment governance goal of Zhangjiakou City, Hebei Province.

*Keywords:* water environment governance; total maximum daily load; water quality evaluation index; rivers in Zhangjiakou City, Hebei Province

Main urban water system: The rivers in Zhangjiakou City belong to three basins, namely: inland river basin, Luan he river basin and Hai he river basin. There are mainly five water systems, namely: inland river system, Luan River system, Yong ding River system, Chao bai River system and Daqing River system.

The purpose of the study is to use the concept of maximum daily load (TMDL) to control the river water environment in Zhangjiakou City, Hebei Province, Based on the construction and application of the TMDL model system, fully considering meeting the needs of residents' life and recreation, according to site conditions investigation, determine the plots and control rates in the drainage area where the source low-impact development measures can be implemented, and determine the source control plan. Construct a drainage network system and couple it with the two-dimensional surface to form a drainage model. Determine the specific location, waterlogging situation and waterlogging risk analysis of the waterlogging area in the region, and formulate a process gray pipe network restoration project plan. It mainly solves the problem of non-point source pollution of rainwater discharged into the river in the urban area of Zhangjiakou.

The study is based on the construction and application of the TMDL model system to determine the method and technical route of total volume control, Carry out the entire process of stormwater runoff pollution control, organically unify source emission reduction, process control and comprehensive treatment, and achieve comprehensive project compliance.

1. Main urban water system: The rivers in Zhangjiakou City belong to three basins, namely: inland river basin, Luan he river basin and Hai he river basin. There are mainly five water systems, namely: inland river system, Luan River system, Yong ding River system, Chao bai River system and Daqing River system.

2. Overall objective: With the goal of restoring the function of river water bodies, comprehensively assess the urban water volume (infiltration, retention, evaporation), water quality (non-point source pollution, point source pollution) and water ecology (river protection, ecological restoration) and various issues based on The construction and application of the TMDL model system scientifically guides the comprehensive improvement of the water environment in Zhangjiakou City.

3. Remediation measures and innovative measures: At present, among the water quality management technologies in various countries in the world, the US Environmental Protection Agency's Total Maximum Daily Load (TMDL) is the most mainstream system. TMDL is the daily environmental carrying capacity of pollutants in the receiving water body. USEPA uses TMDL to calculate the daily capacity of pollutants and is used to standardize water quality standards. After years of improvement and development, a complete system of total control strategies and technical methods has been gradually formed.

By establishing hydrology, hydrodynamic and water quality models, this project simulates the rainfall runoff process, groundwater flow, river channels and the migration and transformation of various pollutants in the catchment area. Since it cannot be achieved with only one model, the coupling of four models HSPF, SWMM, HECRAS and EFDC is used to simulate the hydrology, hydrodynamics and water quality from the upstream catchment area to the downstream water body. Each model needs to be calibrated and verified before it can be used for prediction, evaluation, design and other purposes.

4. Water model coupling: (1) The simulation range and interface of the four models of HSPF, HECRAS, SWMM, and EFDC in Zhangjiakou City.

Based on the construction and application of the TMDL model system, fully considering meeting the needs of residents' life and recreation, according to site conditions investigation, determine the plots and control rates in the drainage area where the source low-impact development measures can be implemented, and determine the source control plan. Construct a drainage network system and couple it with the two-dimensional surface to form a drainage model. Determine the specific location, waterlogging situation and waterlogging risk analysis of the waterlogging area in the region, and formulate a process gray pipe network restoration project plan. It mainly solves the problem of non-point source pollution of rainwater discharged into the river in the urban area of Zhangjiakou.

Source governance: 1) Roof runoff control

*Rain down tube disconnection.* Most of the rain downpipes in the old community are old and damaged, and many places are connected to the balcony sewage. During the renovation, the old rain down pipes will be connected to the sewage pipe network, and the newly built rain down pipes will be disconnected and drained to biological retention facilities such as transmission-type grass ditch and rain water garden for infiltration and purification treatment. According to different site characteristics and rainwater control requirements, the combination of disconnection measures and rainwater treatment facilities can adopt different forms.

*Green roof.* Set up green roofs in roof areas where conditions permit, and build roof rainwater collection and infiltration systems. In the water system organization form of green roof (square)-rainwater garden-rainwater storage pond-river course, rainwater is purified and then penetrated to ensure the water quality of supplementary groundwater sources and reduce the load of soil removal of pollutants.

*Surface runoff control.* Sponge facilities are set up on the green space and paving around the building to mainly treat the roadway, roof and own rainwater. Roof rainwater is introduced into the rainwater garden through rain downpipes. By adding small rainwater storage facilities, the rainwater is collected and stored at the same time for water replenishment and water exchange, as well as nearby greening and road sprinkling.

Remediation effect: (1) Social benefits

The renovation of Zhangjiakou's urban area has improved the living environment of residents, and improved the green landscape between buildings through greening and sketches; parking spaces have been increased and standardized to make parking more convenient for residents. At the same time, the waterlogging area and time of waterlogging at the intersection and the east area of Xing cun have been greatly reduced, reducing the risk of waterlogging in the urban area of Zhangjiakou and reducing the loss caused by urban waterlogging.

(2) Ecological benefits

On the basis of rain and sewage diversion, Zhangjiakou District has adopted various measures including LID and initial rainwater storage tanks to achieve urban non-point source pollution control. According to the volumetric method, the runoff pollution control rate of urban water is 82.68%, which meets the target requirements and plays a better role in protecting downstream water quality.

Therefore, through the TMDL method and roof runoff control, green roof, surface runoff control. The area and time of waterlogging at the intersection of Xing cun Village and the East District have been greatly reduced, the risk of waterlogging in the urban area of Zhangjiakou has been reduced, and the loss caused by urban waterlogging has been reduced. The urban water runoff pollution control rate was 82.68%, which met the target requirements and played a good role in protecting downstream water quality.

## References

1. Xu Zong xue, Xu Hua shan, Wu Xiao meng. Key technologies in the watershed TMDL plan[J].Progress in Water Resources and Hydropower Science and Technology,2014,34(1):8-13.
2. Edited by Chen Jining. Theory and Application of Digital Management of Urban Drainage Pipe Networks[M]. Beijing: China Construction Industry Press, 2010:277.
3. Zhou Hui ping, Gao Chao, Zhu Xiao dong. Identification of key source areas: agricultural non-point source pollution control methods[J].Acta Ecologica Sinica,2005,25(12):3368-3374.
4. He Jun chao, Li Mingming, Liu Rui, Bai Wei lan, Wang Qi. Study on the Overflow Pollution Control System of Combined System at Home and Abroad[J].Environmental Engineering,2021,39(4):42-49.
5. Fu Hai jun, Meng Zhen hu, Cai Zhi biao. Comparison and selection of installation and construction methods of drainage risers in urban villages based on cases[J].Engineering Construction and Design,2020(24):131-132.
6. Peng Xin yu, Tang Yan, Tang De shan, Yang Qing qing. Research on Water Pollution Treatment Plan of Yuxi River Basin Based on TMDL Plan[J].China Rural Water and Hydropower,2019,0(10):24-27.
7. Han Wen hui, Dang Jin hua, Zhao Ying, Liu Juan. Summary of research on water quality goal management technology in river basin[J].Environment and Sustainable Development,2020,45(5):133-137.
8. Gao Xue long. The feasibility analysis of the proposal and application of the intercepted comprehensive drainage system[J]. Water Supply and Drainage,2013,39(5):45-49.

**ПРОЦЕСНИЙ ПІДХІД В ОЦІНКІ ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ОРГАНІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА****І.С. Скороход<sup>1</sup>, П.М. Скрипчук<sup>2</sup>, Г.М. Шпак<sup>2</sup>**<sup>1</sup>*Волинський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк,*<sup>2</sup>*Національний університет водного господарства та природокористування,  
Рівнеpetroskrupchuk@gmail.com.*

Постійно зростаючий споживчий попит на органічну продукцію, а також загальносвітова тенденція до сталого ведення сільського господарства, зумовлюють науковий пошук інновацій процесного підходу в органічному секторі економіки.

Проблемами органічного виробництва та землекористування займалися Т.О. Чайка, В.А. Чудовська, Р.М. Безус, П.М. Скрипчук, О.І. Шкуратов, Г.М. Шпак, [1 - 6]. Однак питання процесного підходу, що пов'язані із оцінкою соціально-економічної ефективності органічного землекористування та виробництва залишаються не вирішеними. Зокрема, потребує дослідження оцінка впливу виробництва органічної продукції на соціально-економічний розвиток регіону та громад у контексті процесів системного підходу в бізнесі та ефективності функціонування інституції – держава.

Метою статті є здійснення оцінки економічної ефективності органічного землекористування шляхом впровадження положень процесного підходу у складовій системного бізнесу та економічного обґрунтування розвитку органічного виробництва. Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання: здійснити еколого-економічну оцінку витрат для організації органічного землекористування й виробництва продукції; визначити вплив виробництва та споживання органічної продукції на соціально-економічний розвиток регіону; розрахувати соціально-економічний ефект від запровадження органічного землекористування.

Світовий ринок органічної продукції щороку зростає та характеризується тенденцією до перевищення попиту над пропозицією. Для українських аграріїв виробництво органічної продукції та сировини для її виготовлення є перспективним, оскільки це дає можливість розширення ринків збуту. Органічне виробництво за більш ніж 10 років розвитку в Україні, довело не тільки свою перспективність та інвестиційну привабливість, а й екологічну та соціальну значимість. Наразі Україна займає 20-те місце у світі та 11-те місце в Європі за площею органічних земель, що становить близько 467 тис. га (близько 1,1% від загальної площі сільськогосподарських угідь) [7-9].

В рамках проекту Стратегії сталого розвитку України до 2030 року передбачено збільшити площу органічних сільськогосподарських земель до 3 млн га (тобто з 1,1% до 7% від площі) та починаючи з 2020 року, забезпечити щорічний приріст обсягів виробництва та реалізації органічної продукції щонайменше на 5% [7 - 9]. Натомість, Європейський Союз має наміри до 2030 року збільшити площі під органічним землеробством до 25% (зараз цей показник складає 8%). При цьому не менше 10% сільськогосподарських земель повинні бути перероблені в «живі території» з великим біологічним розмаїттям.

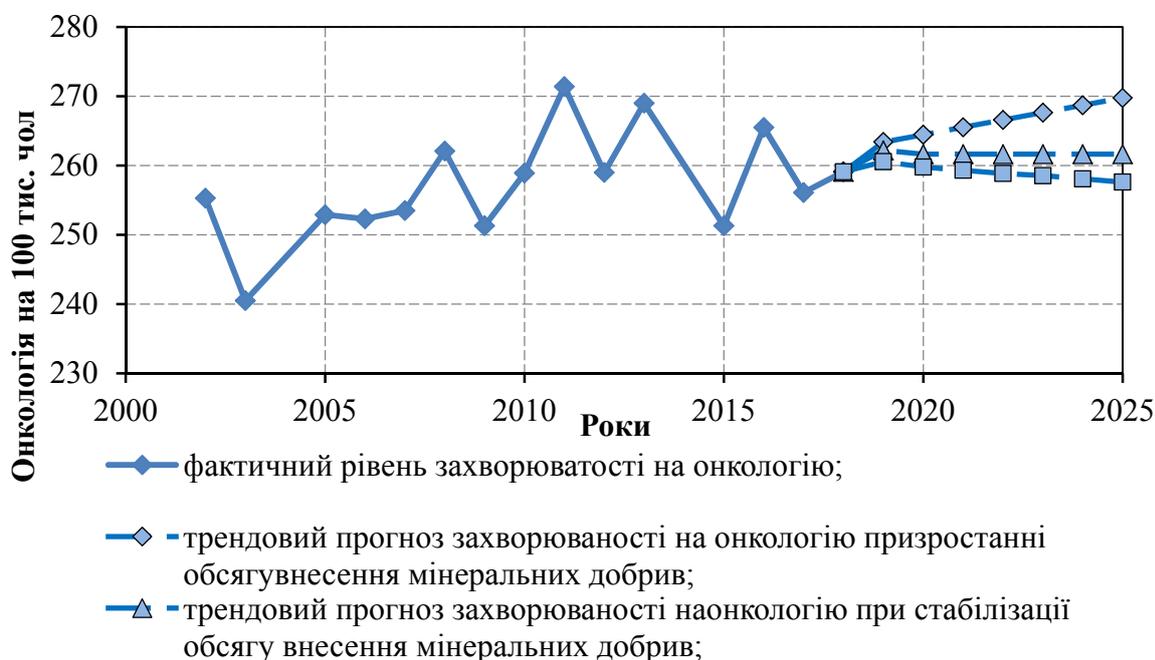
Основи процесного підходу в органічному виробництві та землекористуванні закладені в працях П. Скрипчука, Г. Шпак, Д. Захарової де доведено та апробовано різні методики та методології еколого-економічної оцінки використання сільськогосподарських земель для органічного землекористування на прикладі Рівненської та Житомирської областей тощо. Одним із наступних завдань є обґрунтувати економічну потребу в стабілізації агроекологічного стану земель, підвищити їх родючість, ліквідувати негативні наслідки попереднього землекористування з метою зменшення економічних збитків через зниження врожайності культур під час перехідного періоду.

Використавши методику визначення розміру витрат на відновлення родючості ґрунтів [4, 5], нами було розраховано витрати на стабілізацію якісного стану 1 га сільськогосподарських угідь для Західного Полісся, а саме Волинської, Рівненської, Житомирської та Київської областей. Дані витрати включають суму витрат на розкислення ґрунту, відновлення мінімально-оптимального вмісту фосфору і калію, відновлення рівня вмісту гумусу. Згідно розрахунків, враховуючи річні норми внесення добрив (біогумусу – 4 т/га, зернистих фосфоритів – 2 т/га, калію хлористого – 0,2 т/га) стабілізаційний період розтягнеться на 3-4 роки.

Розрахунок обсягу витрат на стабілізацію якісного стану ґрунтів показують потенційному інвестору (фермеру) можливі додаткові капітальні вкладення від розміру яких залежатиме прийняття майбутніх управлінських рішень.

В Україні, починаючи з 2003 р., спостерігається загальна тенденція до нарощення обсягів внесення агрохімікатів у ґрунт, залишки яких тривалий час залишаються у НПС, їжі та організмах і здатні поширюватися на тисячі кілометрів. Людина, у випадку накопичення пестицидів в організмі, схильна до загрози різного роду захворювань, у т.ч. онкологічних [10 - 12]. Таким чином, виробництво органічних харчових продуктів має низку задокументованих і потенційних переваг для організму людини, що, в свою чергу, значно знизить рівень захворюваності населення в майбутньому.

Щоб встановити вплив технологій, що використовуються на даний час у сільському господарстві, на стан здоров'я населення, нами було проаналізовано статистичні дані щодо кількості онкологічних захворювань за період 2002-2018 рр. у Рівненській області. За нашими даними отримано модель для розрахунку прогностичних оцінок захворюваності у Рівненській області на найближчі роки (рис.). Згідно з прогностичними показниками при існуючих темпах нарощування використання мінеральних добрив відбудеться збільшення рівня онкозахворюваності у 2025 р. у порівнянні з 2018 р. на 4,12%. Це свідчить про необхідність переходу до альтернативних екологізованих способів ведення сільського господарства, що дозволить зменшити, або стабілізувати обсяг використання мінеральних добрив задля покращення здоров'я населення. Встановлено, що за умови зменшення обсягу використання мінеральних добрив у Рівненській області на 10% у 2025 році, в порівнянні з 2018 роком, рівень онкозахворюваності населення знизиться на 5,71%.



**Рисунок – Прогноз динаміки онкозахворювань залежно від зміни обсягу внесення мінеральних добрив на 1 га посівної площі у Рівненській області**

Джерело: розраховано автором на основі [10 - 12].

Соціально-економічний ефект від запровадження органічного землекористування ( $E$ ), тобто зниження захворюваності населення внаслідок зменшення внесення мінеральних добрив на 1 га посівної площі визначаємо за формулою:

$$E = E_{лік} + E_{соц} + E_{вал} \quad (1);$$

де  $E_{лік}$  – скорочення витрат у сфері охорони здоров'я на лікування населення від хвороб;

$E_{соц}$  – зменшення суми виплат із фонду соціального страхування на період тимчасової непрацездатності хворих;

$E_{вал}$  – запобігання втрат валової продукції за час хвороби працівників, зайнятих в матеріальному виробництві.

Результати розрахунку соціально-економічного ефекту від вирощування органічної продукції зведено в табл.

Таблиця – Розрахунок соціально-економічного ефекту від зниження захворюваності населення внаслідок запровадження органічного землекористування

Період	Економія витрат на лікування онкохворих				Економія витратків на соціальне страхування, тис.грн	Втрати валової доданої вартості продукції, тис.грн	Видатки на діагностику та лікування новоутворень, тис.грн	Всього, тис.грн	
	щорічні витрати на лікування, тис.грн								всього, тис. грн
1 рік	49,16	229,16	137,37	68,69	484,38	937,55	306,085	2159,72	3887,737
2 рік		229,16	137,37	68,69	435,22	233,51	367,302		1036,032
3 рік			137,37	68,69	206,06	127,37	244,868		578,297
4 рік				68,69	68,69	42,46	122,434		233,577
<i>Всього</i>	49,16	458,32	412,12	274,75	1194,35	1340,88	1040,69	2159,72	<b>5735,643</b>

*Джерело: розраховано авторами*

Отже, за допомогою процесного підходу, еколого-економічних розрахунків, математичного моделювання встановлено зв'язок між обсягом внесення мінеральних добрив та рівнем онкологічної захворюваності в Рівненській області. Доведено, що вразі поступового зменшення обсягів внесення мінеральних добрив на 10%, за 5 років кількість онкохворих в області зменшення на 17 чол. Тоді, економія витратків державного бюджету на їх лікування протягом 4 років становитиме 1194,352 тис. грн. Економія виплат для хворих із пенсійного фонду та фонду соціального страхування – складатиме 1340,88 тис. грн. Втрата доданої вартості продукції в області через збільшення кількості непрацездатного населення становитиме 1040,69 тис. грн. Частиною соціально-економічного ефекту також є економія витратків в сумі 2159,72 тис. грн на діагностику та лікування новоутворень у дорослих та дітей.

Висновки. В результаті проведених досліджень встановлено, що організація ефективного виробництва органічної продукції потребує використання методології процесного підходу для обґрунтування ефективності запровадження і розвитку органічного виробництва. Наприклад, використання синергетичних принципів економіки аграрного природокористування та процесного підходу, моделювання процесів у визначенні еколого-агрохімічних критеріїв, економічна ефективність для бізнесу, громади й держави з використанням ІТ-розробок та геоінформаційних технологій.

Встановлено, що при існуючих темпах нарощування використання мінеральних добрив відбудеться збільшення рівня захворюваності викликаной новоутвореннями у 2025 р. у порівнянні з 2018 р. на 10,2%, а рівень онкології – на 4,12%. Натомість, за умови зменшення обсягу використання мінеральних добрив у Рівненській області на 10%, у 2025 році порівняно з 2018 роком захворюваність населення викликана появою новоутворень знизиться на 565 чол (6%), а рівень онкозахворюваності – на 17 чол (5,71%). Крім того, аналіз вікової структури хворих показав, що хвороби пов'язані з появою новоутворень у 96% випадків діагностують у дорослих (старше 18 років).

Таким чином, процесний підхід та система еколого-економічного обґрунтування витрат на організацію екологічного та органічного землекористування надає можливість здійснити оцінку впливу виробництва органічної продукції на соціально-економічний розвиток регіону та громад, що визначає ефективність органічного виробництва.

### Література

1. Чайка Т.О. Розвиток виробництва органічної продукції в аграрному секторі економіки України: монографія / Т. О. Чайка. – Донецьк : Вид-во «Ноулідж» (Донецьке відділення), 2013. – 319 с.
2. Безус Р.М. Організаційно-економічні засади ефективного розвитку органічного агровиробництва: монографія / Р.М. Безус – Дніпропетровськ: Лізунов Пресс.–2014.– 380 с.

3. Еколого-економічний механізм розвитку органічного сільського господарства: теорія і практика: монографія / В.А. Чудовська, О.І. Шкуратов, В.В. Кипоренко – К.: ДКС-Центр, 2016. – 332 с.
4. Інформаційне забезпечення розвитку органічного сільського господарства: монографія / Скрипчук П. М., Пічура В. І., Терновий Ю. В. Та ін. – Рівне: НУВГП, 2018. – 180 с.
5. Шпак Г.М. Удосконалення оцінювання сертифікованих сільськогосподарських земель / Г. М. Шпак // Економіка та держава. 2013. – 6. – С. 77-81.
6. Ефективність виробництва органічної продукції сільськогосподарських підприємств [Текст] : автореф. Дис. ... канд. екон. Наук : 08.00.04 / Захарова Дарина Сергіївна ; Нац. Ун-т вод. Госп-ва та природокористування. – Рівне, 2015. – 20 с.
7. The World of Organic Agriculture 2019 / <https://www.organic-world.net/yearbook/yearbook-2019/pdf.html>.
8. FiBL Statistics – European and global organic farming statistics / <https://statistics.fibl.org>.
9. Проект Закону України : Про Стратегію сталого розвитку України до 2030 року / [http://search.ligazakon.ua/l\\_doc2.nsf/link1/JH6YF00A.html](http://search.ligazakon.ua/l_doc2.nsf/link1/JH6YF00A.html)
10. Методичні рекомендації щодо розрахунків науково обґрунтованої потреби сільгосптоваровиробників у добривах за результатами агрохімічного обстеження, балансу азоту, фосфору і калію та прогнозування вмісту рухомих форм поживних речовин у ґрунті. – „Центрдержрідючість”, 2007. – 26 с.
11. Офіційний сайт Міжнародного агентства з дослідження раку. / <https://www.iarc.who.int/>
12. Збірники показників здоров'я населення та діяльності медичних закладів Рівненської області за 2000-2018 рр. / [За ред. Я.О. Маслія]. – Рівне: ІСЦМС РОДА.

УДК 542.06; 542.08; 542.973; 538.911

## СИНТЕЗ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКОГО КООРДИНАЦИОННОГО ПОЛИМЕРА ФУМАРАТА ЦИРКОНИЯ ДЛЯ УСТРОЙСТВ СОРБЦИИ ВОДЯНОГО ПАРА

Д.Ю. Сахаревич<sup>1</sup>, В.В. Паньков<sup>1</sup>, Т.Г. Шутова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Химический факультет БГУ, Минск*

<sup>2</sup>*ГНУ “Институт химии новых материалов НАН Беларуси”, Минск, shutova@ichnm.by*

Металлоорганические координационные полимеры (МОКП) благодаря высокой удельной площади поверхности (до 10000 м<sup>2</sup>/г) и стабильной трехмерной мезопористой структуре являются отличными сорбентами водяных паров, способными в зависимости от природы металлического иона и органического лиганда в МОКП обратимо сорбировать до 1300 мг/г воды в диапазоне температур окружающей среды и обладающими выраженными S-образными изотермами сорбции. МОКП привлекают внимание как новые материалы для экологически чистых технологий преобразования тепла и воды, основанных на цикле сорбции/десорбции водяного пара.

Фумарат циркония (Zr-fum), известный как MOF-801 [0-0] и имеющий микропористые полости диаметром 5-7 Å, пригодные для сорбции в них небольших молекул, обладает высокой термической и химической стабильностью. Известно, что у порошка фумарата циркония, синтезированного согласно [0,0], точка перегиба изотермы сорбции находится в области экстремально низких относительных давлений водяных паров ( $p/p_0 \sim 0,05$ ), а водопоглощение при высокой относительной влажности ( $p/p_0 \sim 0,90$ ), достигает 400-450 мг/г. С точки зрения применения фумарат циркония является одним из перспективных осушителей в электронных устройствах, где требуется минимальная влажность, и сорбентов для генераторов атмосферной воды для засушливого климата. Помимо этого, Zr-fum может быть использован для селективного удаления токсичных загрязнений из питьевой и сточных вод, а также обладает способностью поглощать CO<sub>2</sub> [0-0].

Цель работы: получить порошки фумарата циркония (Zr-fum) с кристаллической структурой, имеющие заданные характеристики поглощения водяного пара. В рамках работы использованы три методики модулированного кислотами синтеза фумарата циркония, а полученные соединения исследованы методами рентгеновского дифракционного анализа, ИК-спектроскопии, динамического лазерного светорассеяния, а также изучено их водопоглощение при различном относительном давлении водяного пара.

**Экспериментальная часть.** Циркония (IV) оксид-дихлорид октагидрат (>99%, Supelco), циркония (IV) ацетилацетонат (>98%, Sigma-Aldrich), фумаровая кислота (>99%, Acros Organics), му-

равьиная кислота (90%, Supelco), уксусная кислота ледяная (хч) использовались без дополнительной очистки.

Синтез фумарата циркония проводили по трем различным низкотемпературным методикам с использованием муравьиной и уксусной кислот в качестве модуляторов синтеза [1-3]. Для сравнения использовали образец Zr-Fum, синтезированный при 120 °С в течение 24 ч согласно [4] с использованием уксусной кислоты в качестве модулятора.

Для синтеза Zr-fum-1 по модифицированной методике [1] навеску хлорокиси циркония (199,8 мг) растворяли в 12,0 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O при комнатной температуре. К полученному раствору приливали муравьиную кислоту (100 экв., 2,3 мл), а затем в реакционную смесь добавляли 208,8 мг фумаровой кислоты, выступающей линкером. Полученную смесь перемешивали при температуре 47-53 °С в течение 1 часа. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и отделяли твердый остаток центрифугированием (5000 об/мин, 15 мин). Полученный Zr-fum-1 трижды промывали водой и высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при T = 110 °С.

Zr-fum-2 был синтезирован по методике [2] растворением 389,7 мг ацетилацетоната циркония и 92,7 мг фумаровой кислоты в 2 мл 50%-го раствора уксусной кислоты в воде с последующим перемешиванием в течение 24 ч при комнатной температуре (~18 °С). Твердый остаток отделяли центрифугированием (5000 об/мин, 15 мин), промывали один раз водой и три раза этанолом и сушили до постоянной массы при 65 °С в сушильном шкафу.

Для синтеза Zr-fum-3 согласно [3] в круглодонной колбе объемом 250 мл растворяли 15,6 мл муравьиной кислоты в 75,4 мл воды. К раствору порционно добавляли 1,34 г хлорокиси циркония, а затем после полного растворения соли - 1,45 г фумаровой кислоты. Смесь нагревали до кипения с обратным холодильником и выдерживали в течение 24 ч. После охлаждения смеси, твердый осадок отделяли путем центрифугирования (5000 об/мин, 15 мин), редиспергировали в смеси этанола с водой (1:1), а затем в чистом ацетоне. Осадок сушили при температуре 65 °С до постоянной массы.

Спектры ИК с Фурье преобразованием МОКП записывали на приборе Tensor 27 ("Bruker", США) в таблетках KBr. Фазовую идентификацию полученных МОКП проводили с помощью рентгенографических спектров, зарегистрированных на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3.0 на CoK $\alpha$  излучении. Среднечисловой гидродинамический диаметр ( $d_N$ ), индекс полидисперсности (PDI) и  $\zeta$ -потенциал частиц МОКП измеряли на анализаторе Zetasizer NanoZS, Malvern, Великобритания. Водопоглощение образцов характеризовали на анализаторе влажности MAX 50, Radwag, Польша. Предварительно исследуемые образцы фумарата циркония помещали в атмосферу, насыщенную водяным паром, на 24 ч. Заданное величину относительного давления водяного пара  $p/p_0$  в газовой среде поддерживали за счет использования насыщенных растворов солей (LiCl, MgCl<sub>2</sub>, NaBr, NaCl, KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и сухого КОН [0]. Температуру и влажность среды вблизи поверхности порошка определяли с помощью шупа термогигрометра ТКА-ПКМ, Россия.

**Результаты и обсуждение.** В ИК спектрах исследуемых образцов Zr-fum (рис. 1) между 1300 и 1600 см<sup>-1</sup> присутствуют две интенсивные характеристические полосы поглощения карбоксилатных групп -C(=O)-O-. Антисимметричное колебание проявляется при 1558 см<sup>-1</sup>, симметричное - при 1407 см<sup>-1</sup>. В виде плеча при 1656 см<sup>-1</sup> присутствуют колебания карбоксильной группы незамещенной фумаровой кислоты.

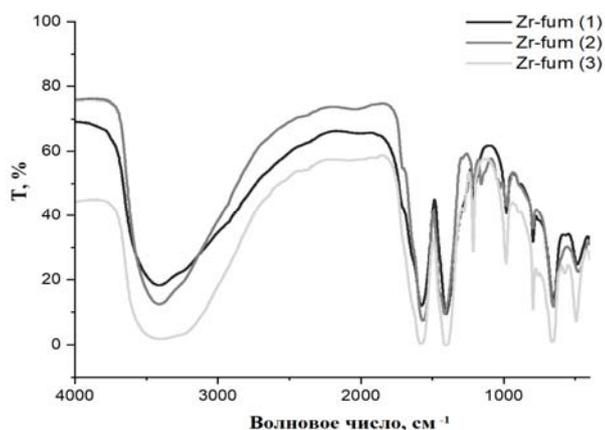
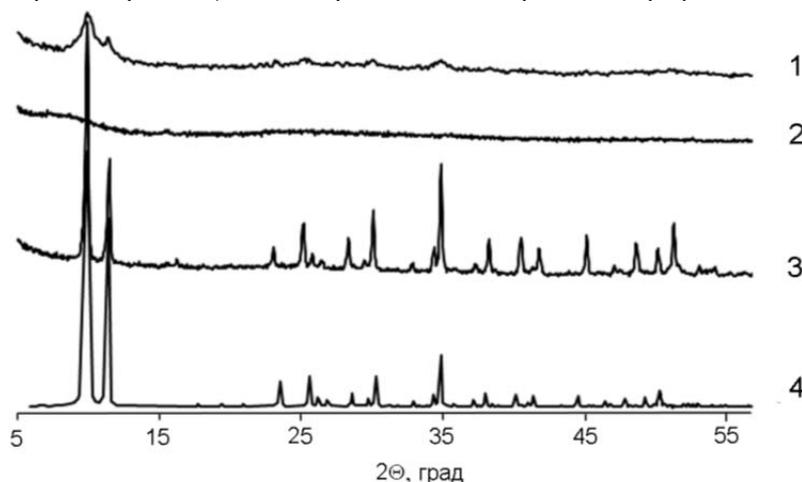


Рисунок 1. – ИК-спектры синтезированных образцов фумарата циркония

Группу полос в диапазоне  $1200-1100\text{ см}^{-1}$  можно связать с колебаниями  $-\text{C}=\text{O}-\text{OH}$  и  $-\text{C}-\text{O}$  функциональных групп фумаровой кислоты в Zr-fum. Появление полосы средней интенсивности при  $494\text{ см}^{-1}$  относится к валентным колебаниям Zr-O. Широкие пики с максимумами в области  $3425\text{ см}^{-1}$ , соответствующие валентным колебанием  $-\text{OH}$  группы, во всех спектрах свидетельствуют о наличии сорбированной воды. Высокоинтенсивные характерные полосы функциональных групп в ИК-спектрах исследуемых образцов подтверждают структуру фумарата циркония.

На рис 2. представлены рентгенографические спектры исследуемых образцов Zr-fum в сравнении со спектром фумарата циркония, смоделированным по кристаллографическим данным [0].



**Рисунок 2. – Рентгенографические спектры; 1 - Zr-fum-1; 2 - Zr-fum-2; 3 - Zr-fum-3; 4 – расчёт по кристаллографическим данным [0]**

В спектре Zr-fum-1 присутствуют малоинтенсивные широкие отражения при  $2\theta$ , характерные для модельного спектра фумарата циркония, а в спектре Zr-fum-2 рентгеновские рефлексы полностью отсутствуют, что указывает на аморфную или сильно разупорядоченную кристаллическую структуру этих образцов. При синтезе Zr-fum-1 и Zr-fum-2 было использовано недостаточное количество модулятора (муравьиной или уксусной кислоты), что наряду с низкой температурой синтеза, не позволяет сформироваться кристаллической структуре, характерной для фумарата циркония.

В случае Zr-fum-3 положение всех экспериментальных дифракционных рефлексов хорошо согласуется со стандартными литературными значениями для фумарата циркония MOF-801 [0]. Дифракционных рефлексов от других кристаллических фаз не обнаружено, что указывает на высокую степень чистоты и кристалличность полученного порошка.

Гидродинамический размер частиц Zr-fum, определенный методом динамического лазерного светорассеяния, зависит от способа получения, причем наименьшими размерами обладает образец Zr-fum-3, имеющий кристаллическую структуру (Таблица). Для него также характерен высокий положительный  $\zeta$ -потенциал.

**Таблица – Гидродинамический диаметр и  $\zeta$ -потенциал частиц МОКП**

МОКП	$d_N$ , нм	PDI	$\zeta$ -потенциал, мВ	Водопоглощение*, мг/г
Zr-fum-1	$2696\pm 504$	$0,67\pm 0,07$	$3,2\pm 1,8$	$558\pm 50$
Zr-fum-2	$605\pm 44$	$0,39\pm 0,03$	$17,4\pm 0,2$	$349\pm 47$
Zr-fum-3	$250\pm 4$	$0,38\pm 0,02$	$26,0\pm 0,3$	$679\pm 113$

\*RH =  $90\pm 2\%$ , T =  $18\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

Сравнение свойств фумарата циркония, синтезированного в различных условиях, показывает, что образец Zr-fum-3, с выраженной кристаллической структурой и субмикронным размером частиц, обладает наибольшей емкостью по водяному пару, а аморфные Zr-fum-1 и Zr-fum-2 уступают ему по водопоглощению (Таблица).

На рис. 3 приведены зависимости поглощения водяных паров различными пористыми адсорбентами от относительного давления водяного пара в газовой фазе. Как и для других пористых

сорбентов, для Zr-Fum-3 характерна S-образная изотерма сорбции, однако резкий рост водопоглощения начинается при влажности менее 16%, что меньше, чем для таких известных сорбентов как молекулярные сита 4А и фумарат алюминия.

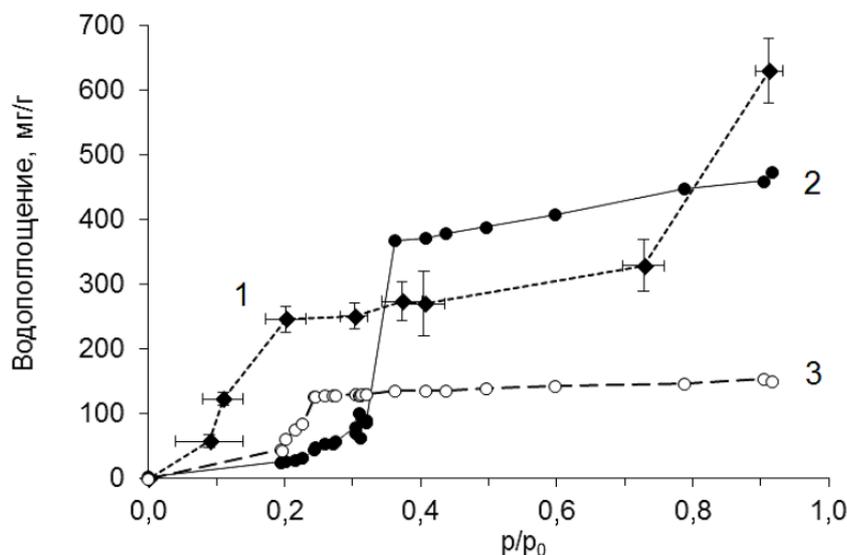


Рисунок 3. – Изотермы сорбции водяных паров различными пористыми материалами: 1 – Zr-fum-3; 2 – фумарат Al; 3 – молекулярные сита 4А. T = 20±1 °C

Таким образом, синтезирован кристаллический порошок фумарата циркония с субмикронным размером частиц, водопоглощение которого превышает характеристики молекулярного сита 4А во всем диапазоне парциальных давлений водяного пара.

#### Список использованных источников

1. Zahn, G. Insight into the mechanism of modulated syntheses: in situ synchrotron diffraction studies on the formation of Zr-fumarate MOF / G. Zahn [et al.] // CrystEngComm. – 2014. – Vol. 16, iss. 39. – P. 9198–9207
2. Çamur, Ceren Advances on the Synthesis of MOFs at Scale : Doctoral Thesis ... PhD in Materials Science / Ceren Çamur. – Barcelona : Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Department of Chemistry- Faculty of Science, 2019. – 192 P
3. Taddei, M. An Optimised Compaction Process for Zr-Fumarate (MOF-801) / M. Taddei [et al.] // Inorganics. – 2019. – Vol. 7, iss. 9. – P. 110–122
4. Zahn, G. A water-born Zr-based porous coordination polymer: Modulated synthesis of Zr-fumarate MOF / G. Zahn [et al.] // Microporous Mesoporous Mater. – 2015. – Vol. 203, iss. 1. – P. 186–194
5. E. Leung, U. Müller, N. Trukhan, H. Mattenheimer, G. Cox, and S. Blei, US 2012/0082864 A1.
6. ГОСТ 28237-89. Камеры неинжекционного типа для получения постоянной относительной влажности. Введ. 01.03.1990. М.: Стандартинформ, 2006. 9 с.
7. Ke, F. Fumarate-based metal-organic frameworks as a new platform for highly selective removal of fluoride from brick tea / F. Ke [et al.] // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8, № 939. – P. 1–11

**PHYTOTESTING OF TOXICITY OF CULTURAL FLUID  
OF BACTERIA *BACILLUS VELEZENSIS***

**N. Tkachuk<sup>1</sup>, L. Zelena<sup>2</sup>, S. Krapyvnyi<sup>3</sup>, Y. Podterher<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*T.H. Shevchenko National University "Chernihiv Colehium", Chernihiv, Ukraine,  
nataliia.smykun@gmail.com*

<sup>2</sup>*Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of  
Ukraine, Kyiv, zelenalyubov@gmail.com*

<sup>3</sup>*Chernihiv Lyceum 32, Chernihiv, Ukraine, sk0982463946@gmail.com*

Representatives of the genus *Bacillus* are actively studied as controlling agents of biodamage, in particular some metals [1]. *Bacillus velezensis* strains (heterotypic synonyms of which are species names of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus*, *B. oryzicola*, *B. methylotrophicus* subsp. *plantarum* [2]) deserve attention, as they have significant potential in counteracting biological damage, which is determined by both antimicrobial properties [3] and the ability to inhibit the formation of biofilms of corrosive bacteria on the surface of the material [4]. Previously, we isolated and identified strains of *B. velezensis* NUChC C1 and NUChC C2b with the ability to inhibit the development of biofilms of sulfate-reducing bacteria [4]. For the practical use of the cultural fluids, their low toxicity is important [5]. Onions (*Allium cepa* L.) are considered as a standard test object for determining toxicity [6-8]. Therefore, the aim of this work was to study the test parameters of *A. cepa* under the influence of culture fluid of bacteria *B. velezensis* NUChC C2b.

A 5-day pure culture of *B. velezensis* strain NUChC C2b [4] was used in the experiments. Incubation was performed in meat-peptone broth (MPB) under aerobic conditions and at a temperature of  $29 \pm 2$  °C. The culture grown in MPB and with a cell count of  $1 \times 10^8$  cells/ml (0.5 McFarland) was used in the following variants: C2b<sub>1:9</sub> - culture of *B. velezensis*:distilled water 1:9; C2b<sub>9:1</sub> - *B. velezensis* culture:distilled water 9:1. MPB solution:distilled water 1:9 was used as a control.

The test plant was selected onion (*A. cepa*), variety Chalcedony. The seeds of the plant in the phytotest were grown in Petri dishes on filter paper moistened with a suitable solution in the dark at a temperature of  $23.0 \pm 2.0$  °C. The experiment was laid down in triplicate. On the 5th day, the energy of seed germination and the biometric parameter - the length of the roots - were determined.

The root length index (RLI), which describes the phytotoxicity index, was calculated by the formula (1),

$$RLI = \frac{L_T(i) - L_C}{L_C} \quad (1)$$

where  $L_T(i)$  and  $L_C$  are the mean root lengths in the test (i) and in the control, respectively. Based on the published empirical value of risk assessment [9-11], phytotoxicity can be divided into four classes, such as:

weak ( $-0.25 \leq RLI < 0$ ),

average ( $-0.5 \leq RLI < -0.25$ ),

high ( $-0.75 \leq RLI < -0.5$ ),

extreme toxicity ( $-1 \leq RLI < -0.75$ ).

The phytotoxic effect of solutions (PhTE) was calculated by formula (2) [12],

$$PhTE = \frac{L_C - L_T(i) \times 100}{L_C} \quad (2)$$

where  $L_T(i)$  and  $L_C$  are the average root lengths in the test (i) and in the control, respectively.

Statistical processing of the obtained data was carried out using the statistical module of Microsoft Office Excel 2010. We used the methods of descriptive statistics for calculation of the arithmetic mean (M) and the standard error of the arithmetic mean (m) [13]. The Student's significance criterion (t) was calculated, and the 95% probability of differences ( $p \leq 0.05$ ) was considered statistically significant.

The results of the study of phytotoxicity of culture fluid solutions *B. velezensis* are presented in Table 1.

Table – Test-indicators and interpretation of the results

A variant of the experiment	Germination energy relatively control, %	The length of the roots relatively control, %	RLI	PhTE	Interpretation of phytotest results	Comments
C2b <sub>1:9</sub>	121±4	139±25	0,387	-38,70	No toxicity	Weak growth stimulation
C2b <sub>9:1</sub>	67±22	24±3*	-0,764*	76,40	Extreme toxicity	Growth inhibition by more than 50%

Note: RLI - root length index; PhTE - phytotoxic effect of solutions; \* - differences from control are significant at  $p \leq 0.05$

It was found that according to phytotoxic indices, the culture solution of *B. velezensis*:H<sub>2</sub>O 1:9 (variant C2b<sub>1:9</sub>) did not show toxicity and had a stimulating effect on the growth of the test plant. But statistical processing of the results indicates that the differences between the test indicators in the experiment and control are not statistically significant.

With an increase in the concentration of liquid culture *B. velezensis* (variant C2b<sub>9:1</sub>), a significant inhibition of the growth of the test plant was observed - the solution turned out to be extremely toxic. The statistical processing of the results indicates the statistical significance of the differences between the test indicators in the experiment and control. The obtained results are determined by the composition of the culture fluid of the studied bacteria. Thus, it is known that depending on the strain, metabolites of *B. velezensis* are bacilysin, bacillibactin, difficidin, fengycin, bacillaen, macrolactin, surfactin, plantathizolicin, subtilin, mersacidin, bacillomycin, locilomycin, amylocyclicin, nematicide [14-16].

It would be important to study the phytotoxicity of the solution of culture *B. velezensis*:H<sub>2</sub>O at a ratio of 1:5, because it is at this concentration of culture fluid showed a decrease in biofilm formation of sulfate-reducing bacteria [4].

Thus, in the phytotest with onions, the phytotoxicity of the culture fluid of *B. velezensis*:H<sub>2</sub>O at a ratio of 1:9 was not established, but the extreme toxicity at a ratio of 9:1 was reliably shown. The prospect of further research is to assess the phytotoxicity of the culture fluid of *B. velezensis*:H<sub>2</sub>O at a ratio of 1:5.

### References

1. Tkachuk N., Zelena L. The Impact of Bacteria of the Genus *Bacillus* upon the Bio-damage/Biodegradation of Some Metals and Extensively Used Petroleum-Based Plastics. *Corros. Mater. Degrad.* 2021. Vol. 2. P. 531–553.
2. Dunlap Ch.A., Kim S.-J., Kwon S.-W., Rooney A.P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2016. No 66. P. 1212–1217.
3. Dimopoulou A., Theologidis I., Benaki D., Koukounia M., Zervakou A., Tzima A., Diallinas G., Hatzinikolaou D.G., Skandalis N. Direct Antibiotic Activity of Bacillibactin Broadens the Biocontrol Range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere.* 2021. Vol. 6, Issue 4. e0037621.
4. Tkachuk N., Zelena L., Lukash O., Mazur P. Microbiological and genetic characteristics of *Bacillus velezensis* bacillibactin-producing strains and their effect on the sulfate-reducing bacteria biofilms on the poly(ethylene terephthalate) surface. *Ecological Questions.* 2021. Vol. 32, Issue 2. P. 119-129.
5. Zain W.S.M., Salleh N.I.H., Abdullah A. Natural Biocides for Mitigation of Sulphate Reducing Bacteria. *International Journal of Corrosion.* 2018. P. 1-7.
6. Constantin M.J., Owen E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assay. A report of US EPA Gene-Tox programme. *Mutation Research.* 1982. Vol. 99. P.1–12.
7. Cauhan L.K.S., Saxena P.N., Gupta S.K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environ. Exp. Bot.* 1999. Vol. 42. P.181–189.
8. Nilüfer A., Serap C., Senay S., Dilek Y., Özelm Ö. Evaluation of clastogenicity of 4,6-Dinitro-*o*-cresol (DNOC) in *Allium* root tip test. *J. Biol. Environ. SCL.* 2008. №2. P.59–63.
9. Bagur-González M.G., Estepa-Molina C., Martín-Peinado F., Morales-Ruano S. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water sat-

urated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments*. 2011. Issue 11. P. 281-289.

10. Mtisi M., Gwenzi W. Evaluation of the phytotoxicity of coal ash on lettuce (*Lactuca sativa* L.) germination, growth and metal uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019. Issue 170. P. 750-762.

11. Cai X., Ostroumov S.A.. Finding of toxicity of herbal shampoo to plant seedlings: phytotest of mixture product that contains membranotropic chemicals as components. *Ecologica*. 2021. Vol. 28, Issue 101. P. 6-10.

12. Багдасарян А.С. Биотестирование почв техногенных зон городских территорий с использованием растительных организмов: дис. канд.биол.наук: 03.00.16 / Багдасарян Александр Сергеевич. Ставрополь, 2005. 159 с.

13. Плохинский Н.А. Биометрия. Москва: Изд-во Московского ун-та, 1970. 368 с.

14. Pan H.Q., Li Q.L., Hu J.C. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent. *J. Biotechnol.* 2017. Vol. 247. P. 25-28.

15. Balderas-Ruiz K.A., Bustos P., Santamaria R.I., González V., Cristiano-Fajardo S.A., Barrera-Ortiz S., Mezo-Villalobos M., Aranda-Ocampo S., Guevara-García Á.A., Galindo E., Serrano-Carreón L. *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*. 2020. Vol. 10, Issues 1. P. 163.

16. Silva F.J., Ferreira L.C., Campos V.P., Cruz-Magalhães V., Barros A.F., Andrade J.P., Roberts D.P., de Souza J.T. Complete Genome Sequence of the Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* UFLA258 and Its Comparison with Related Species: Diversity within the Commons. *Genome Biol Evol.* 2019. Vol. 11, Issues 10. P. 2818-2823.

УДК 502.131

## ПРОЕКТ ФЕРМЫ ЛЕСНОГО САДОВОДСТВА В БЕЛЬГИИ

**Д.А. Тарасова, Л.Е. Совик**

*Высшая школа коммерции, Университет, Льеж, Бельгия, [tarasovazr@gmail.com](mailto:tarasovazr@gmail.com)  
Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, [sovik8293@gmail.com](mailto:sovik8293@gmail.com)*

Одну из первых бельгийских ферм в Арденнах, построенную на принципах лесного садоводства, создает молодая семейная пара фермеров. У этого проекта четыре аспекта: экологический, предпринимательский, исследовательский и образовательный.

Экологический характер проекта в том, что ферма большую часть времени будет функционировать самостоятельно, как в природе. Это так называемая экосистема лесного садоводства. Она включает различные виды фруктовых и ореховых деревьев, кустарников, трав и многолетних овощей, урожаи которых напрямую полезны для человека. Здесь важен выбор растений-компаньонов с учетом местных особенностей климата. Они будут расти в последовательности слоев, сходной со средой обитания в лесу. Опавшие листья послужат натуральными удобрениями. В хозяйстве не будет химических удобрений. Для борьбы с вредителями и проведения своеобразной уборки своего лесного сада фермеры предполагают запускать животных с фермы: сначала кур, затем свиней. Например, куры поедают червей, свиньи - корни и сорняки. Это натуральный корм для животных. В свою очередь, помет станет удобрением для сада. Фермеры пока не нацелены на получение сверхприбылей. Ни животные, ни растения не будут получать никаких искусственных химических подкормок или усилителей роста. В основе проекта лежит концепция пермакультуры - гармоничного сосуществования различных экосистем. За счет правильной посадки человеческий труд через несколько лет сократится до минимального участия.

Экологический аспект проекта отвечает взглядам экологических фермеров: идея, помимо дохода, должна сделать этот мир немного лучше как для себя, так и для других. Этот взгляд отличает их от тех биотехнологов, которые считают, что «спасти» человечество голода можно, «создавая» основные сельскохозяйственные культуры посредством генетической модификации. Нельзя дальше закрывать глаза на то, что традиционные методы ведения сельского хозяйства приводят ко все большей деградации почв из-за эрозии, засоления, чрезмерного использования химических удобрений, разрушения поддерживающих экосистем.

Исследовательский аспект проекта связан с его новизной для Бельгии. Он даст интересную базу для научных исследований, проводимых совместно с сотрудниками Льежского университета. Сейчас изучаются анализы почвы, выбираются наиболее подходящие сорта растений - компаньонов для посадки. Задача исследователей состоит в том, чтобы разработать проекты максимально устойчивых систем, адаптированных к региональным почвенно-климатическим условиям для производства продуктов питания. Леса растут и поддерживают себя без вмешательства человека, исследователи и практики изучают и копируют эти модели для создания рукотворных лесов с деревьями и растениями, которые используются людьми в пищу и для других нужд.

Термин «лесное садоводство» ввел исследователь из Великобритании Роберт Харт [2], который в течение 1980 годов адаптировал его принципы применительно к умеренному климату. Подходы Р.Харта позже были развиты Мартином Кроуфордом и пермакультуралистами Патриком Уайтфилдом и Джеффом Лоутоном. Понятие пермакультуры ввел в научный оборот Билл Моллисон [1], включивший семислойную систему Харта в качестве общего элемента дизайна пермакультуры. Многие пермакультуралисты являются сторонниками лесных садов или пищевых лесов, такие как Грэм Белл, Патрик Уайтфилд, Дэйв Джек, Эрик Тоенсмайер и Джефф Лоутон. Эти энтузиасты создавали лесные сады и делились своим опытом в книгах: «Сад пермакультуры» (Белл, 1995 г.), «Как сделать лесной сад» (Уайтфилд, 2002 г.), «Съедобные лесные сады» (Джек и Тоенсмайер, 2005 г.), и в фильме «Создание продовольственного леса» (Лоутон, 2008 г.).

Лесное садоводство основано на лесных экосистемах, включающих фрукты и ореховые деревья, кустарники, травы, виноградные лозы и многолетние овощи. Оно устойчиво и требует минимального ухода. Здесь используют растения-компаньоны, смешивая их слои для лесной среды обитания. Р.Харт разработал семислойную систему лесного сада: 1) слой «Сапору», состоящий из исходных зрелых плодовых деревьев; 2) «слой низких деревьев» из более мелких орехов и фруктовые деревья на карликовых корневищах; 3) «Кустарник» из фруктовых кустов, таких как смородина и ягоды; 4) «Травяной слой» из многолетних овощей и трав; 5) «Ризосфера» или подземное измерение растений, выращиваемых ради корней и клубней; 6) «Почвопокровный слой» из съедобных растений, которые распространяются горизонтально; 7) «Виноградных лоз и вьющихся растений». Лесной сад - это практически самоподдерживающаяся живая экосистема. Лесные сады представляют собой трехмерные структуры в отличие от двухмерных полей с монокультурами.

Предпринимательский аспект проекта предполагает создание бизнеса, не менее рентабельного, чем обычные коммерческие сельскохозяйственные системы. Перечислим основные выгоды, которые предприниматель может получить от лесных садов:

- высокая производительность, поскольку высокая плотность посадок позволяет получить хорошие урожаи;
- биоразнообразие обеспечивает постоянное получение продуктов для продажи питания в течение большей части года;
- натуральные мульча, компост и удобрения собственного производства обеспечивают экономии на закупках. Лесные сады, как и лес, замульчируются и покрывают почву самостоятельно, чтобы удерживать влагу. Высокая плотность растений обеспечивает большое количество опавших листьев для перегноя, добавляя в почву органические вещества. Дождевые черви и другие природные расщепители органических веществ, помогают естественному процессу компостирования;
- богатая живая экосистема привлекает птиц и хищников, что в дальнейшем будет способствовать естественной борьбе с вредителями;
- смешивание разных видов растений-компаньонов создает естественную синергию, которая приносит пользу всем задействованным растениям. В результате растения более устойчивы к вредителям и болезням и более продуктивны;
- естественный компост, подобный лесной подстилке, сохраняет и даже улучшает почву, корни гниют, образуя в почве тысячи замысловатых каналов для воздуха и воды.

Бизнес-компонент проекта фермы в Арденнах предусматривает приготовление и продажу готовых сетов из продуктов, выращенных на ферме, в течение большей части года. Никаких маркетинговых кампаний по привлечению покупателей фермеры не планируют, рассчитывая на отзывы клиентов и рекламу «из уст в уста».

Образовательная сторона проекта связана с его пионерским характером. Поскольку фермеры из Арденн - первые в области лесного садоводства в Бельгии, то их опыт будет интересным для единомышленников в разных странах и откроется через мастер-классы и обучающие программы.

### Список использованных источников

1. Пермакультура [Электронный ресурс] Режим доступа://<https://hmong.ru/wiki/Permaculture> – Дата доступа: 13.10.2021
2. Харт, Роберт. Лесное садоводство: выращивание съедобного ландшафта (2-е изд.). Уайт-Ривер-Джанкшн, Вирджиния: Челси-Грин, 1996. – ISBN 9781603580502.

УДК 631.615

## ПРОБЛЕМЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ БЕЛОРУССКОГО ПОЛЕСЬЯ

**С.В. Тыновец, В.С. Филипенко**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

В результате быстрого развития научно-технического прогресса и интенсивного использования природных ресурсов одной из важнейших проблем современности является восстановление и поддержание экологического равновесия. На планете уже трансформировано 70% природных экосистем. Разрушенные сообщества сами становятся загрязнителями окружающей среды. Состояние окружающей среды зависит от масштабов производства, от уровня производительных сил и технологий, а темпы экономического развития и эффективность производства во многом определяются состоянием природной среды. Нерациональное природопользование приводит к снижению качества природных ресурсов, их исчерпанию, подрыву восстановительных сил природы, загрязнению окружающей среды, снижению её оздоровительных и эстетических свойств[1,2].

Одним из наиболее важных направлений в практике природоохранной деятельности является социально-экономическое обоснование природоохранных мероприятий, которое в настоящее время производится путём сопоставления результатов природоохранных мероприятий с затратами, необходимыми для их осуществления.

Социальное обоснование природоохранных мероприятий выполняется путём сравнения эффекта, выраженного в сохранении и улучшении здоровья населения, с затратами, необходимыми для получения этого эффекта. Следовательно, измерение результата природоохранной деятельности сводится к оценке предотвращённого экономического ущерба. При сведении результата природоохранной деятельности к предотвращённому ущербу не только остался без внимания целый ряд социальных и экономических результатов, но и возникают серьёзные трудности, связанные с выделением собственно экономического результата деятельности человека на природу. Ориентация природоохранной деятельности на максимизацию предотвращённого ущерба не соответствует месту, которое должна занимать природоохранная деятельность в системе общественных отношений. Состояние окружающей среды в значительной мере определяет благосостояние членов общества[2,3,5].

В современных условиях хозяйствования непосредственный результат природоохранной деятельности находится вне сферы экономических интересов и природоохранный результат возникает лишь как косвенный побочный по отношению к основному результату. Ещё в 20-е годы прошлого века в народном хозяйстве существовали платежи за природные ресурсы (попенная плата, водный сбор, плата за разработку месторождений, земельная рента-плата). Однако в то время не существовало необходимых предпосылок для эффективного применения платежей, поэтому большая часть этих платежей была унифицирована в одном платеже – налог с оборота. Впоследствии эти платежи опять вводятся в экономическую практику (1974-1982гг.). Однако эти элементы недостаточно хорошо увязаны с другими звеньями хозяйственного механизма, и не существует единой комплексной оценки природных ландшафтов, что значительно затрудняет установление оптимальных пропорций (соотношения) антропогенного и естественного ландшафта даже на региональном уровне [1,4,6].

Одним из уникальных районов биосферы является Белорусское Полесье, занимающее 6,1 млн. га, экологическое состояние которого оказывает существенное влияние на окружающую среду и социально-экономическое развитие не только республики Беларусь, но и на страны Европы. Особенную ценность для европейских и общепланетарных биосферных процессов имеют болотные ландшафты Полесья. Чистая первичная продукция болот составляет в среднем 2000 г/м<sup>2</sup> в год, что в 2-3 раза выше чем с лесокустарниковых сообществ и культивируемых сельскохозяйственных угодий. В связи с проведением крупномасштабных мероприятий в зоне Белорусского Полесья по

осушению переувлажнённых земель существенно изменилось соотношение антропогенного и естественного ландшафта [1,4,6].

Многие районы имеют около 70 % мелиорируемых земель. С осушенных земель производится около 50 % производимой продукции растениеводства. Потенциальные возможности мелиорированных земель, современный уровень земледелия, позволяет повысить их продуктивность в 1,5 раза и превратить в гарантированный источник получения продукции. Однако нерациональное использование торфяно-болотных почв приводит к их минерализации и быстрой потере мощности торфяного слоя. Так, в Полесье слой торфа ежегодно уменьшается на 1-2 сантиметра, вследствие чего происходит снижение плодородия почв. Ветровой эрозии подвергается до 25 % пахотных земель, потери почвы составляют 2 т или в пересчёте на урожай зерновых культур до 3 ц/га, водной эрозии подвергается менее 15 % площадей, потери от которой составляют до 2 ц/га в пересчете на урожай зерна. Обеспеченность лесополосами на мелиорируемых землях составляет 1 % при норме 3 %. В тоже время 1 га лесополос защищает 30 га сельскохозяйственных угодий. На осушенных болотных почвах развиваются эллювиальные процессы, усиливается вынос химических элементов из почвы и происходит загрязнение поверхностных и грунтовых вод. Учитывая возрастающие дозы использования минеральных удобрений, ускоренные темпы развития промышленности, можно прогнозировать увеличение скорости приближения качества сельскохозяйственной продукции к предельно допустимым концентрациям, особенно по содержанию калия, нитратов, хлора, сульфатов. В связи с понижением уровня грунтовых вод на мелиорируемых объектах происходит ряд негативных процессов и явлений на прилегающих территориях, что приводит к выпадению ценных растений, пересыханию малых рек, ухудшению микроклимата. [1,4,5].

Мелиорируемые земли рассматриваются как решающий фактор дальнейшего подъёма сельского хозяйства, устойчивого наращивания продовольственного фонда республики. Однако огромные масштабы мелиорации и высокая плотность радионуклидного загрязнения в зоне Белорусского Полесья усложнили решение задачи обеспечения высокой экономической эффективности использования земли и капитальных вложений. Анализ показывает, что с 1965г. по 1980г. урожайность на мелиорируемых землях выросла с 18 до 36 ц корм. ед. с 1 га, а к 2015 году урожайность снизилась на них до 25-30 ц,

Снижение продуктивности осушенных земель происходит как по линии ресурсной необеспеченности, так и за счёт физического и морального износа систем, срок службы которых составляет более 40 лет или около 70 % износа. На системах складывается неблагоприятный водно-воздушный режим, увеличиваются затраты на ремонт, и, главное, большинство из них не отвечают современным требованиям интенсивного ведения сельскохозяйственного производства.

Восстановление работоспособности гидромелиоративных систем (а это в основном реконструкция) требует замены отдельных элементов системы, для которых существует определённая величина долговечности. Так, нормативный срок службы дренажа 40 лет, но за этот период износ его составляет 63,7 %, а остаточная стоимость равна 36,3 % и после реконструкции других элементов такую систему можно эффективно использовать. Это создаёт условия теоретически неограниченного срока службы мелиоративных систем.

Расчёты показывают, что окупаемость мелиоративных систем в настоящее время составляет 25-30 лет при нормативе 7-10 лет, а международный опыт свидетельствует, что реформирование субъектов хозяйствования эффективно при обеспечении процесса расширенного воспроизводства. Для мелиорируемых земель процесс расширенного воспроизводства может быть обеспечен при урожайности с них не менее 40 ц корм. ед. с 1 га.

Учитывая, что наиболее загрязнёнными радионуклидами из сельскохозяйственных культур являются травы, то первоочередными объектами реконструкции должны стать водооборотные системы, имеющие более высокий удельный вес трав в севообороте. Эти системы дают большую загрязнённость продукции, но имеют более высокую эффективность и располагают потенциальными возможностями более оперативного управления УГВ, а следовательно и процессом управления накопления радионуклидов.

Водооборотные системы обеспечивает наиболее близкий к оптимальному для растений УГВ (отклонение составляет от 0 до 14 см), в то время как на осушительно-увлажнительных и увлажнительных системах отклонение составляет до 25-30 см. Таким образом, на водооборотных системах потери урожайности значительно ниже (7-9 ц корм. ед. против 15-18 ц корм. ед. на осушительных системах).

Таким образом, зная зону расположения корневой системы, имея возможность управлять УГВ посредством мелиоративных систем, используя прибавки урожайности сельскохозяйственных

культур от расположения УГВ и зная вынос радионуклидов растениями (с разных горизонтов почвы при различных УГВ), можно регулировать процесс снижения радионуклидов в продукции.

Результаты исследований показывают, что содержание цезия-137 в травянистых кормах, получаемых на переувлажненных участках критических осушительных систем, превышает, как правило, нормативные уровни. В то же время, в травах, выращенных на технически совершенных водооборотных мелиоративных системах, обеспечивающих оптимальный водный режим корнеобитаемого слоя, содержание радионуклидов значительно ниже и не превышает нормативный уровень.

#### **Список использованных источников**

1. Мееровский А.С. Система земледелия на мелиорированных антропогенно-преобразованных почвах / Мееровский А.С., Даутина Д.Б., Семенченко А.В. // Мелиорация переувлажненных земель – 2004. – №2(52). – С.171-184

2. Цыбулько С. Н., Зайцев А. А., Семененко Н. Н. Радиологическая оценка применения азотных и калийных удобрений на антропогенно – преобразованной торфяной почве при возделывании многолетних трав. – Экологический вестник, № 2 (28). – Минск, 2014. – 116 с.

3. Цыбулько Н.Н. Использование загрязненных радионуклидами антропогенно-преобразованных торфяных почв на территории Белорусского Полесья / Цыбулько Н.Н., Зайцев А.А., Филипенко В.С. // Природные ресурсы полесья: оценка, использование, охрана Ч.2. – Пинск 2015, - 88-92 с.

4. Тыновец С.В. Экономическая эффективность возделывания бобово-злаковых травостоев / С.В. Тыновец, В.С. Филипенко, А.Ф. Веренич // Мелиорация : научный журнал. – 2013. – № 2(70). - С. 119-128.

5. Тыновец, С.В. Сохранение пойменных почв как составной части биосферы при антропогенном воздействии / С.В. Тыновец // Экологический вестник : научно-практический журнал. - 2011. - № 1 (15). - С. 89-96.

6. Проблемы и перспективы развития органического земледелия в Припятском Полесье Республики Беларусь / П.М. Скрипчук [и др.] // Збалансоване природокористування : науково-практичний журнал. – 2018. – № 3. – С. 40-49.

УДК 330.34/631.1

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ РАЗМЕРОВ ПЛАНТАЦИИ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ КАК ФАКТОР РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ**

**В.С. Филипенко, С.В. Тыновец, Н.Н. Рубан, Н.Н. Безрученок**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*

В настоящее время в Республике Беларусь имеется недостаток в обеспечении населения плодово-ягодной продукцией. Естественно, что спрос на ягодную продукцию в основном удовлетворяется видами традиционных культур (садовая земляника, малина, смородина, крыжовник и др.) и дикорастущими. В целях увеличения объемов производства и улучшения качества плодов и ягод, насыщения потребительского рынка качественной плодово-ягодной продукцией и продуктами ее переработки, снижения импорта и наращивания экспортного потенциала утверждена и реализуется Государственная целевая программа развития пловодства «Пловодство», которой предусматривается решить следующие основные задачи: расширить сортовой состав плодовых и ягодных культур, в том числе нетрадиционных, за счет иммунных и высокоустойчивых к болезням и вредителям сортов; укрепить материально-техническую базу отрасли; перейти на производство оздоровленного и тестированного посадочного материала, удовлетворить потребности республики в высококачественном посадочном материале плодов и ягодных культур; осуществить закладку новых садов интенсивного типа, в том числе в сырьевых зонах перерабатывающих организаций; заложить плантации нетрадиционных плодовых и ягодных культур; продлить сроки потребления ягод и фруктов в свежем виде, за счет строительства плодохранилищ и цехов по заморозке ягод[1,2,3].

Определение оптимальных размеров плантации промышленного производства голубики высокорослой позволяет не только рационально использовать финансовые, материальные природные и трудовые ресурсы, но и позволяет обеспечить более высокую эффективность производства. При

организации промышленного производства голубики высокорослой высаживается 40-50% ранне-спелых, 30-40% среднеспелых и 10-15% позднеспелых сортов. Инвестиции в промышленное производство голубики высокорослой зависят от состояния участка, типа почвы и контурности поля. Ориентировочные затраты на создание плантации промышленного производства составляют 86212,8 руб/га, в т.ч. средства ежегодного использования (переменные затраты) 34234 руб/га, амортизация средств многолетнего использования (постоянные затраты) 6237,5 руб/га.

Подготовка почвы включает: обеспечение pH 3,5-4,5, внесение пестицидов и элементов минерального питания, а также обработка почвы. Подготовка субстрата состоит из смешивания кислого торфа, древесной щепы, серы, формированием гребня и полива. Наиболее затратным этапом плантации является приобретение и посадка саженцев, уход за растениями, что составляет около 42% всех затрат[4,5,6,7]. Размер затрат по элементам промышленной технологии и создания плантации голубики высокорослой отображено в таблице 1.

Расчёт окупаемости затрат на создание плантации промышленного производства голубики высокорослой приведёт в таблице 2.

При производственной себестоимости в среднем за год 40471,5 руб/га себестоимость 1 т ягод при урожайности 6 т/га составляет 6745 руб/т и при цене 10000 руб/т, рентабельность производства составляет 47,96 % или срок окупаемости равен 2,1 год.

Таблица 1. – Затраты на создание плантации голубики высокорослой, руб/га

Мероприятия	Затраты	
	минимальные	максимальные
Планирование участка	3500	3500
Корректировка	388,9	1296,3
Внесение гербицида	226,8	291,7
Внесение почвенного инсектицида	453,7	518,5
Обработка почвы	194,4	388,9
Подготовка субстрата	6144,4	9994,4
Внесение серы	759,9	759,9
Затраты на систему орошения	3581,0	3581,0
Агроткань для мульчирования	8652,7	8652,7
Формирование гребней	2592,6	2592,6
Внесение торфа в ямы для посадки	1944,4	1944,4
Саженцы в контейнерах (3333 шт)	21602,7	54006,9
Посадка саженцев	3240,7	3240,7
Скашивание междурядьев	583,3	583,3
Полив	6351,8	7648,1
Внесение удобрений в р-ре	1296,3	1296,3
Обработка растений	972,2	972,2
Сбор урожая (оплата труда)	5833,3	12151,8
Ограда	5925,9	5925,9
Обрезка растений	138,8	324,1
Строительство системы капельного орошения	938,8	1324,0
Работы и услуги	136	154
Подкисление воды	1717,5	1717,5
Горючесмазочный материал	1883	2296
Электроэнергия	479,8	589,6
Прочие затраты	271	271
Расходы на содержание основных средств	1024	3787
Расходы на организацию производства	1143	1778
Итого	86212,8	137023,9

Точка безубыточности рассмотренной промышленной технологии с урожайностью 6 т/га составляет 1,4 т/га, а также безубыточности площади посадок голубики высокорослой при 100 га

составляет 24,2 га. Наибольшее влияние на эффективность промышленной технологии плантации голубики высокорослой оказывает уровень урожайности ягод.

Так, при урожайности ягод 5 т/га точка безубыточности производства составляет 1,97 т/га, а точка безубыточности площади посадок 39,6 га. А при урожайности 4 т/га выращивание ягод с данным уровнем затрат становится не эффективным. Точка безубыточности определяется на уровне 4,3 т/га и 108 га при 100 га посадок.

Создание производств ягодной продукции, несмотря на все перипетии, сегодня является одним из самых рентабельных видов деятельности фермерских хозяйств. Проекты по открытию фермерских хозяйств по выращиванию ягодной продукции выращенных экологически чистым методом (голубика, клубника, малина и др. ягодные культуры) и их реализации, при этом хозяйственная деятельность будет также обеспечивать повышение плодородия почвы, как никогда актуальны в настоящее время [2,4,6,7].

Таблица 2. – Расчет окупаемости создания плантации голубики высокорослой

Показатели	
Производственные затраты всего, руб/га	86212,8
Средства использования (переменные затраты), руб/га	34234
Средства многолетнего использования всего, руб/га	51978,8
Амортизация средств многолетнего использования (постоянные затраты), руб/га	6237,5
Производственная себестоимость в среднем за год, руб/га	40471,5
Производственная себестоимость 1 т ягод при урожайности 6 т/га	6745
Цена 1 т ягод, руб	10000
Прибыль на 1 т ягод, руб	3235
Прибыль на 1 га, руб	19410
Рентабельность, %	47,96
Срок окупаемости	2,1
Точка безубыточности, т/га	1,4
Точка безубыточности при 100 га	24,2

Создание производств с оптимальными размерами позволит обеспечить рынок ягодной продукцией (голубика, клубника, малина). Осуществление данных проектов будет иметь социальный эффект, который выражается в создании дополнительных рабочих мест в сельской местности, повышения жизненного уровня работников хозяйства и улучшения уровня качества питания населения, а также уменьшится нагрузка на природный комплекс.

#### Список использованных источников

1. Государственная целевая программа развития плодоводства «Плодоводство» на 2021—2025 годы
2. Рекомендации по производству органических ягод в трансграничных районах Украины и Беларуси (с учетом требований стандартов ЕС): справочное пособие /Л.Е. Совик, П.М. Скрипчук, С.В. Тыновец [и др.]. – Минск: Мисанта, 2018. – 262 с.
3. Оптимизация структуры посадочных площадей органических ягодных культур / В. С. Филипенко, О. В. Орешникова, С. В. Тыновец // Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы: сборник трудов XII международной научно–практической конференции, Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь, 27 апреля 2018 г. - Пинск : ПолесГУ, 2018. - С. 154-156.
4. Шевчук М.Й., Бортнік Т.П. Голубика высокорослая: технология выращивания/ М.Й. Шевчук, Т.П. Бортнік. – Луцк : ПП Іванюк В.П., 2017.- 430 с.
5. Экономическая эффективность технологий органического земледелия / В. С. Филипенко [и др.] // Сборник трудов XIV международной научно-практической конференции ”Устойчивое развитие экономики: состояние, проблемы, перспективы - Пинск: ПолесГУ, 2020. - С. 80-82.
6. Переход от традиционного к биоорганическому земледелию в Республике Беларусь/ К.И. Довбан [и др.]; под общ. ред. К.И. Довбана: Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т природопользования – Минск : Беларуская навука, 2015. – 89с.

7. Проблемы и перспективы развития органического земледелия в Припятском Полесье Республики Беларусь / П. М. Скрипчук, С.В. Тыновец, В.С. Филипенко, И.В. Тыновец // Збалансоване природокористування: науково-практичний журнал. – 2018. – № 3. – С. 40-49.

УДК 502.3/7:504

## EFFECTS OF ANTHROPOGENIC FACTORS ON THE GEOLOGICAL ENVIRONMENT OF SHANDONG PROVINCE

Xu Yanhui<sup>1</sup>, V. Lemiasheuski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*All-Russian research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Borovsk, Russia, [lem@iseu.by](mailto:lem@iseu.by), [2826380336@qq.com](mailto:2826380336@qq.com)*

With economic and social development, scientific and technological progress and accelerated urbanization, human activities have become a major geological force on earth. As a province with a large population in China, Shandong province has a population of 102 million in 2021. Human factors have a great impact on the geological environment. These changes are subtly affecting people's lives, and these negative effects have attracted more and more attention.

*Keywords:* geological environment, anthropogenic effects, geological disasters

Geological environment system is an organic whole within a certain range which responds to human economic and technological activities. It is a complex artificial and natural complex system.

Geological environment system is a whole system composed of human factors based on natural geological environment. The internal balance of the system needs to be maintained, and the interaction between subsystems or parts will break the balance, thus changing the function and behavior of the whole system.

Research Objective. To study the causes and countermeasures of geological environment destruction in Shandong Province.

### I. Effects of anthropogenic factors on geology

*1.1 Geological environment.* Geological environment is an important part of natural environment, is a kind of precious natural resources, is the material basis and prerequisite for the sustainable development of human society. Human activities are based on and restricted by the geological environment, and at the same time affect and change the geological environment. [1].

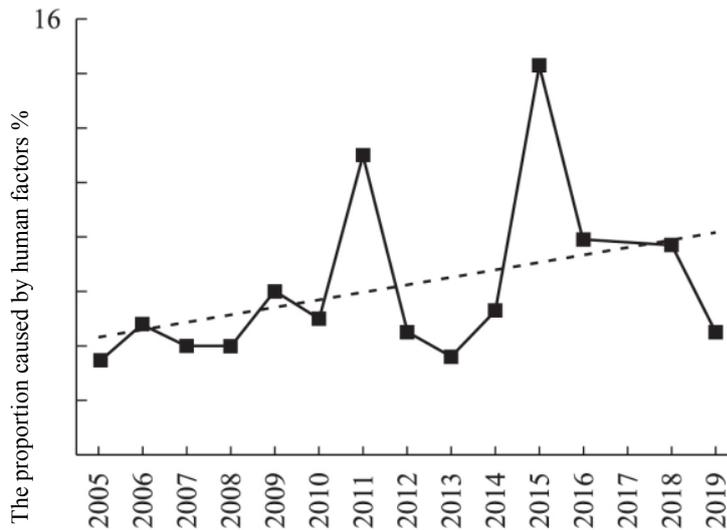
*1.2 Man-made damage to geological environment.* Human activities have a profound impact on landforms and processes, both constructive and destructive, from the erosion of arable land to construction and mining. The man-made damage to geological environment is mainly caused by engineering excavation, loading, blasting, soil abandonment, land reclamation, excessive extraction of groundwater and so on. Common man-made geological disasters include collapse, landslide, debris flow, ground collapse, ground crack and ground subsidence.

In this figure (1), the solid line is the annual variation of the proportion of geological disasters caused by human factors, and the dotted line is the trend line. In the period of underdeveloped social and economic development, natural factors have more influence on geological disasters. However, it can be seen from the figure that the proportion of geological disasters caused by human factors has been slowly rising in the past decade of China.

### II. Introduction of Shandong Province

*2.1 Geographical location.* Shandong province located in the northeast part of the east coast of China, the lower reaches of the Yellow River, and belongs to the North China Plain, between 114°47' 30" ~ 122°42' 18" E and 34°22' 54" ~ 38°27' 00" N. Territory includes Jading Peninsula and inland two parts. The total land area is 157,100 square kilometers, the sea area is 170,000 square kilometers, and the coastline is 3,345 kilometers. The province is divided into 17 prefecture-level administrative regions, under the jurisdiction of 139 county-level administrative regions, the provincial capital Jinan city.

*2.2 Economic development.* Shandong is an economic powerhouse along the east coast of China. In 2020, Shandong's GDP reached 7,312.9 billion yuan, ranking the third in China. Shandong lies between Beijing and Shanghai, connecting the vast interior of China with the vast Western Pacific Ocean and facing Japan and South Korea across the sea.



**Figure – Interannual variation of the proportion of geological disasters caused by human factors in China (2005-2019) [2]**

Shandong has convenient transportation. It only takes 1.5 hours to reach Beijing and 3.5 hours to reach Shanghai by high-speed rail from Jinan. The province's 17 cities are connected by expressways, with a total length of more than 5,000 kilometers.

*2.3 Cultural and history.* Shandong has a long history and is one of the important cradles of Chinese culture and civilization. The Confucian culture represented by Confucius born here is still exerting an influence on the development of world civilization [3].

*2.4 Mineral resources.* Up to now, more than 150 kinds of mineral resources have been discovered in Shandong Province. Among them, there are more than 80 kinds of minerals whose total reserves have been identified. Among the identified minerals, they include metal minerals, energy minerals, hydrogels minerals and non-metallic minerals [4]. Among them, mineral resources such as coal mine, oil, gold mine, copper mine, quartz stone and limestone have high development value.

### **III. The impact of human factors on the geological environment of Shandong**

In China, most geological disasters occur in southern provinces, such as Hunan, Fujian, Jiangxi, Guizhou and Sichuan, etc. Shandong has less geological disasters among all provinces.

But in recent years, with the interaction of many factors, the destruction of geological environment in Shandong is more serious in the 20th century.

The geological environment problems in Shandong are more prominent, such as mining-out collapse, ground subsidence, seawater intrusion, ground fissures and collapse. By 2002, the accumulated land subsidence in Dezhou, Jining and Heze has been more than 300mm, 200mm and 100mm. Saltwater intrusion occurred to varying degrees in the coastal areas of Laizhou Bay and some downstream rivers of coastal cities such as Qingdao, Yantai and Weihai, as well as ground fissure in the southwest and east Shandong [5].

The main reasons are as follows:

1. Demographic factors. Shandong province has a large population base and rapid population growth, which causes pressure on the environment, such as the expansion of cultivated land area and housing space, which causes great damage to the ecological environment. In the 1980s and 1990s, the problems of river siltation, environmental pollution and land degradation in Shandong were more prominent. After years of treatment, there has been a greater degree of improvement.

2. Industrial production factors. In the process of industrial production, if the measures are not appropriate, it is easy to destroy the geological environment. For example, ground subsidence and karst collapse are caused by lowering the groundwater level or excessive exploitation of groundwater in the mining process. Mining, road construction, building and other indiscriminate digging of soil, waste slag, abandoned soil, will cause surface water and soil pollution, sometimes also cause groundwater pollution.

3. Urban planning and construction factors. In the municipal planning and construction of improper, geological environment assessment is not comprehensive enough to carry out construction, such as foundation engineering geological exploration in accordance with the provisions, foundation design does not adapt to geological environment conditions, easy to induce geological disasters.

4. Excessive groundwater harvesting. Due to the rapid development of industrial enterprises, the pollution of water resources is large, the normal water source has been unable to ensure the living water of enterprises and residents, can only increase the use of groundwater.

#### **IV. Prevention and control countermeasures**

Geological environment is the basis for human survival and provides many production materials for human beings, so we must pay attention to the protection of geological environment to ensure ecological sustainable development.

1. Government departments shall strengthen the detection and control of geological environment, strengthen management of relevant departments, enterprises, and individuals, and do a good job in planning services. Shandong province is a big agricultural province in essence, with the development of national economy, there are still a lot of projects to be developed and constructed, and there are also a lot of ecological geological problems to be studied and solved. It can be arranged from the perspective of Shandong's economic structure and productivity development to do a good job in overall control and government services.

2. Correctly handle the relationship between ecological and geological environment protection and economic development and reduce man-made damage. There has always been a contradiction between environmental protection and economic development, but in fact, protection and development are not opposite. While developing the economy, we should not exploit the geological environment, but follow the idea of sustainable development and strike a balance between development and resources, ecology and environment, population and development, and nature and environment.

3. Strengthen the publicity of geological environment protection, raise the public awareness of protection, and jointly safeguard the sustainable development of ecological environment.

**Conclusions.** Economic development and scientific and technological progress should not be the reason of eco-geological environment destruction but should be the opportunity to protect its sustainable development.

Shandong is part of China, and China is part of the world. We are working hard to create a sound ecological environment, establish environmental protection awareness, strengthen the protection of the geological environment, and actively repair or stop destroying the damaged geological environment. Maintain the safety of eco-geological environment and contribute to the sustainable development of mankind.

#### **Reference**

1. Wang liuyang. Study on geological environmental safety and geological environmental comprehensive Evaluation method, May 1st, 2013
2. Qian Yang, Yan Wang, Yuanyuan Ma. Geological hazards in China from 2001 to 2019
3. Shandong Provincial People's Government website <http://www.sdfao.gov.cn/>
4. Lu Shaodong, Xing Quanlin. Research on The Types and Spatial-temporal Distribution characteristics of Mineral Resources in Shandong Province. Rural Economy and Science and Technology, 2018, Vol. 29, Issue 04
5. Zhou Lianying: A Long way to go in Shandong Geological Environment Protection. Shandong Political News 31th, May, 2002

УДК 502.3/7:504

### **STUDY OF URBAN ECOLOGICAL ENVIRONMENT IN THE PROCESS OF URBANIZATION**

**Chen Pei, O. Bodilovskaya**

*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Belarus  
472627455@qq.com*

*Abstract:* There is an interactive relationship between urbanization development and urban ecological environment construction. The relationship between the two should be viewed dialectically, and a scientific management system should be built to promote both sides' coordinated and symbiotic development. Under the current situation, urban ecological environment construction in China is facing the contradiction between urban ecological environment protection and urban economic growth, the deterioration of resources and environment aggravated by urbanization, and the incompatible relationship between market-led and government governance. Based on the model of ecological environment governance in devel-

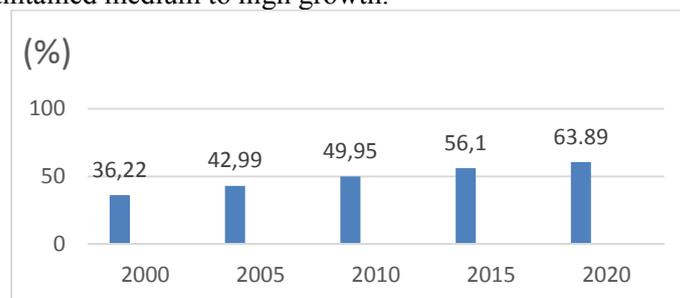
oped countries around the world, we propose measures for the construction and management of the urban ecological environment in China's urbanization process.

*Keywords:* urbanization; ecology

**Introduction.** The impacts of human activities on Earth systems since the Anthropocene are multiple and complex, with urbanization being one of the most important human activities (Hermanns & Li, 2018; Lewis & Maslin, 2015). The continued expansion of global urbanization is observed around the world (Gerten et al., 2019). As urbanization continues to accelerate, the ecological and environmental problems faced by cities are becoming increasingly prominent. To address ecological issues, promote harmony between humans and nature, and facilitate sustainable urban development has become a concern for many people. Professor Ma Shijun, a famous Chinese sociologist and ecologist, proposed the "social-economic-natural" ecological theory as early as 1981 (Ma, Shijun & Wang, Rusong, 1984). This theory (Ouyang, Zhiyun, 2017; R. Wang et al., 2011; Wang, Rusong & Ouyang, Zhiyun, 2012) considers that the current society, economy, and nature on which people live is a large complex interwoven system, in which society is the superstructure of economic development, the economy is the foundation of social development, and the economy is the basis of social development. In this system, society is the superstructure of economic development, the economy is the basis of social development, and the economy is also the intermediary linking nature and society. Nature is the basis of the overall economy, society, and the composite ecosystem. This composite intertwined and integrated ecological view has pushed the study of urban ecology to a new height and has clarified the ideas for solving urban ecological problems. In recent years, against the backdrop of China's accelerating urbanization, the Chinese government has also paid more attention to the issue of urban ecological and environmental governance. In the report at the 19th National Congress of the Communist Party of China (Communist Party of China, 2017), it was emphasized that China should build a system of harmonious coexistence between human beings and nature and create more high-quality ecological products to meet the growing material needs and ecological environment needs of the people. China has reorganized the relationship between society, economy, and nature and analyzed the urban ecological and environmental governance issues from a new height of national and even global ecological development. We believe that with the rapid development of the times, the resonance of scientific and technological innovation and talent drive at the same frequency, and the gradual application of various innovations, urban ecological and environmental governance problems will be able to be solved (Hu et al., 2020; Xie et al., 2020).

### I. Current status of urbanization in China

Since the founding of New China, China's urbanization development level has been rising, especially since the reform and opening up; with the continuous acceleration of China's industrialization process, China's urbanization development has ushered in new opportunities. According to statistics from the National Bureau of Statistics of China, it was found that at the end of 2020, the urbanization rate of China's resident population reached 63.89%, an increase of 14.21 percentage points compared to 2010. The resident urban population reached 901.99 million, an increase of 236.41 million compared to 2010 (National Bureau of Statistics of China, n.d.). From 2000 to 2020, China's urbanization rate is rapidly developing, and the level of urbanization continues to increase. During this period, the massive concentration of labor, capital, and other factors in China's cities and towns generated economies of scale, driving the country's production efficiency and economic growth. According to information published by the IMF (International Monetary Fund Statistics, n.d., pp. 1980-2024), China's GDP in 2000 was US\$1211,347 million, ranking sixth in the world and accounting for 3.6% of world GDP, and in 2020 China GDP is 14722731 million USD, ranking the second in the world and accounting for 17.38% of world GDP. For twenty years, China's economy has maintained medium to high growth.



**Figure 1. – Trends in China's urbanization rate, 2000-2020**

With the increasing urbanization rate, China's urbanized population is growing, which has been an important driving force for cities' social, economic, technological, transportation, cultural, and productive development and has contributed to their rapid growth. However, economic development has certain drawbacks, especially when urban policymakers prioritize economic development; a series of "urban diseases" have gradually emerged, among which ecological and environmental problems are the most obvious (Yasmeen et al., 2019). With the high concentration and continuous growth of the urban population, the consumption needs of urban people are increasing, the exploitation and consumption of natural resources are increasing, the ecological footprint is growing, and the "metabolic" function of the city itself can no longer meet the real needs, which brings a big impact on the ecological balance of nature (Ahmed This has had a major impact on the ecological balance of nature (Ahmed et al., 2020) and has hurt human production and habitat (Yigitcanlar & Teriman, 2015), leading to waste enclosures (Kuang & Lin, 2021), traffic congestion (Rana, 2011), ecosystem degradation and water problems (Grumbine, 2014), air quality (Han et al., 2014), environmental pollution (Y. Sun et al., 2021), public health and population health (Cox et al., 2018; Jiang et al., 2021; Van de Poel et al., 2012), and a host of other issues. In order to solve these problems, the Chinese government has proposed a new type of urbanization development path, emphasizing the need to develop urbanization in an orderly and healthy manner, pay attention to the ecological environment of cities while promoting their economic development, place the ecological environment in the top position of urban development, and follow the ecological civilization, four synchronizations (promoting the simultaneous development of industrialization, informatization, urbanization, and agricultural modernization), people-oriented, cultural heritage, and optimized layout new path (The Central Committee of the Communist Party of China, the State Council of China, 2014). This initiative brings a very favorable effect on the solution of China's urban ecological environment problems. However, it takes a long time to achieve this goal and requires organic cooperation among various departments and personnel. China is still in the stage of exploring and figuring out the construction of this area. There is still a need to further improve the speed and efficiency, and ecological effect of the new urbanization construction in the future (Yu, 2021).

**II. Analysis of the interaction between urbanization development and urban ecology**

Global urbanization has a profound impact on the ecological environment. There is an extremely complex non-linear coupling and forcing a relationship between urbanization and the ecological environment as they intersect and influence each other (Fang et al., 2016). On the one hand, the effective maintenance and development of the urban ecological environment can promote cities' overall sustainable development capacity and continuous innovation vitality (Y. Sun et al., 2021). On the other hand, the rapid development of urbanization will bring opportunities for urban ecosystem maintenance, enhance the government's attention to urban ecosystem construction, and promote effective solutions to urban ecosystem problems (Fang, 2015). Conversely, although habitat and biodiversity conservation has begun to receive more attention, rapid urbanization can also lead to greater pressure on urban ecosystem maintenance, with urban sprawl exacerbating the degree of ecosystem degradation and the resulting direct and indirect impacts continuing to increase (McDonald et al., 2020). Therefore, to promote the effective maintenance of the urban ecological environment, it is necessary to analyze the reality of urbanization development in detail, fine-tune and study the relationship between the two, and formulate guiding measures for their mutual promotion and development at a higher level. Specifically, the interrelationship between the two is shown in figure 2 below.

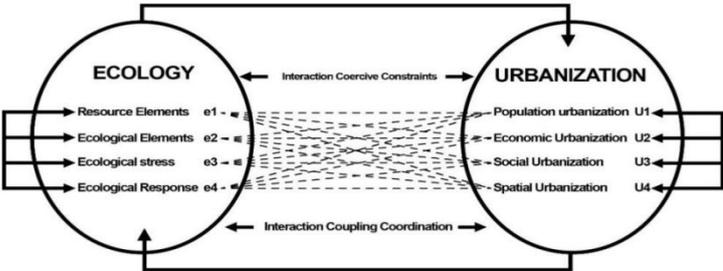


Figure 2. – Map of the interaction between urbanization development and urban ecology

**(i) Effective maintenance of urban ecosystems can promote healthy and sustainable urban development**

The healthy development of cities is based on the ecological environment (Shittu et al., 2021). According to the "social-economic-natural" complex ecosystem theory mentioned above, nature is the basis for overall economic and social development. Only by maintaining the natural environment and promoting ecological balance can we lay the foundation for the city's good economic and social development. If the city does not pay attention to the maintenance of the ecological environment but only focus on economic development, it will inevitably lead to the destruction of the ecological environment; not only people's production and life will be affected, health will also be affected, the city's economic development lacks sufficient power to support, the final result is inevitable "both lose and hurt" ( Ouyang et al., 2016). Therefore, to promote the effective development of urbanization and enhance the overall development of cities, it is necessary to pay attention to the maintenance of the urban ecological environment.

#### **(ii) Rapid urbanization can provide opportunities for urban ecosystem conservation**

Urbanization has become an important trend in China's development. This phenomenon has existed since the founding of New China and has become more pronounced with the deepening development of reform and opening up. The development of urbanization represents the country's progress and reflects people's increasing pursuit of quality of life. With the rapid development of urbanization, China's urban population is increasing, people's demands for urban development are rising, and the government will raise its attention to urban development and strengthen the construction of all aspects of urban operation in conjunction with people's growing needs, which brings opportunities for urban ecological maintenance (Koop & van Leeuwen, 2017). In this context, various urban economic, social, and ecological problems will be solved one by one. The government will develop more scientific management measures to further promote the harmony of the urban ecological environment and drive sustainable development. For example, in 2018, the Central Committee of the Communist Party of China and the State Council of China issued the Opinions on Comprehensively Strengthening Ecological Environmental Protection Resolutely Fighting the Battle of Pollution Prevention and Control (Central Committee of the Communist Party of China, & State Council of China, 2018), and issued the Opinions on Carrying Out Ecological Environmental Protection Laws, Regulations, and Normative Documents Cleaning Work (General Office of the State Council of China, 2018), which comprehensively revised and improved administrative regulations related to ecological, environmental protection and further clarified the path of urban ecological, environmental governance. 2021 China's State Council issued the Action Plan for Carbon Dioxide Peaking Before 2030" (China State Council, 2021) to promote the transformation of China's energy resources, industrial structure, consumption structure, urban and rural construction, and lifestyle to green and low-carbon, and continuously improve ecological and environmental quality.

#### **(iii) Rapid urbanization poses challenges for urban ecology**

In the context of urbanization, the urban population is increasing, and urban waste is multiplying. With a large population, the rapid increase in the rate of urban economic development, while the related environmental protection has not kept up, resulting in a very serious challenge to the urban ecological environment (Koop & van Leeuwen, 2017). When the environmental carrying limit is reached, various resources can hardly meet the realistic needs, and cities will inevitably face a shortage of public green space, water resources, and energy. Environmental pollution problems are getting worse, and cities are no longer livable living spaces for human beings. If the government fails to address the above problems promptly, it will easily lead to a dilemma in the healthy development of cities (Niknamian, 2019; Y. Sun et al., 2021).

### **III. Pressures and challenges of urban eco-environmental construction in China's urbanization process**

#### **(i) Significant contradictions between urban ecological protection and urban economic development**

In developing the urban economy, the relationship between various factors, including the economy and resources, the economy and the environment, etc., should be fully analyzed and explored. The role of various factors should be comprehensively analyzed to make the development of urbanization "holistic" and improve the quality and efficiency of urban development. From the trends and history of development in the world, it is found that there is a significant correlation between the level of economic development and per capita commodity energy consumption, and the total energy consumption will continue to rise with urbanization and the widening of the income gap. Since China's reform and opening up, although China has made significant progress in economic development, there has been a multi-fold increase in energy consumption and increasingly serious ecological pollution. This crude development model, which is based on economic development at the expense of the ecological environment, has to some extent offset the achievements of economic development and has also had an irreversible impact on

the total regional energy supply. The current contradiction between urban ecological and environmental protection and urban economic development in China is even more obvious, and how to balance the relationship between the two, promote the improvement of urban ecological and environmental protection, and further promote the sustainable development of the urban economy has become a problem that China must think about and solve.

#### **(ii) Urbanization has exacerbated resource and environmental degradation**

In the process of rapid urban development, land resources will continue to be strained, and in order to meet the real needs of the original land, use will be changed. The change of land use will also lead to the overall ecological structure of the city is affected and some degree of change. For example, after urban expansion, arable land resources become more strained, the original state of the resource environment no longer exists, and the overall resource structure changes. For example, as urbanization continues, land-use changes, causing changes in urban ecological functions, structures, processes, etc., leading to a decrease in biodiversity, which is a growing risk. The continued expansion of urban construction also brings with it the potential for greater input of environmental pollutants, which to a large extent threatens the environment and has a greater negative impact on ecosystems and individual organisms, putting the human environment, urban ecosystems, and ecological patterns at greater risk.

#### **(iii) Incompatible relationship between market-led and government governance**

In recent years, the Chinese government has increased its attention to urban ecological and environmental protection and has made significant achievements in urban ecological and environmental management from many aspects. Overall, urban ecological environment management is not an easy task; it involves many aspects and requires the cooperation and coordination of many departments. In the environmental management process in China, a top-down approach is usually applied, with the government playing traction and guiding role in the overall management process. In contrast, others follow the government's program. And many cities are facing the phenomenon of emphasis on construction but not management, not focusing on the city to carry out environmental management planning, not being able to invest more funds in environmental maintenance and management, coupled with the lack of material and human resources allocation, resulting in the construction of urban ecological environment is still facing a serious situation. In the future, further analysis and research is needed on how China can further promote the transformation of government functions in urban construction, promote the reform of regulatory approaches, give sustained play to the role of the market, and guide the public to actively participate in the construction of the urban ecological environment.

#### **IV. Concluding remarks**

The accelerating urbanization process has put forward new propositions for constructing and managing the urban ecological environment. The original way of urban ecological environment management has shown many defects. Although countries have different national circumstances and manifestations of environmental problems, they can exchange, absorb and learn from each other's environmental governance experiences. By reforming and optimizing practices related to environmental governance abroad, it is possible to bring beneficial references to urban ecological governance in the urbanization process in the country.

#### **References**

1. Ahmed, Z., Asghar, M. M., Malik, M. N., & Nawaz, K. (2020). Moving towards a sustainable environment: The dynamic linkage between natural resources, human capital, urbanization, economic growth, and ecological footprint in China. *Resources Policy*, 67, 101677. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2020.101677>
2. Banerjee, O., Cicowiez, M., Horridge, M., & Vargas, R. (2019). Evaluating synergies and trade-offs in achieving the SDGs of zero hunger and clean water and sanitation: an application of the IEEM Platform to Guatemala. *Ecological Economics*, 161, 280-291. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2019.04.003>
3. Banerjee, O., Cicowiez, M., Vargas, R., & Horridge, M. (2019). The SEEA-Based Integrated Economic-Environmental Modelling Framework: an Illustration with Guatemala's Forest and Fuelwood Sector. *Environmental and Resource Economics*, 72(2), 539-558. <https://doi.org/10.1007/s10640-017-0205-9>
4. Central Committee of the Communist Party of China, & State Council of China. (2018, June). *Opinions on comprehensively strengthening ecological protection and resolutely fighting the battle of pollution prevention and control*. [http://www.gov.cn/zheng/2018-06/24/content\\_5300953.htm](http://www.gov.cn/zheng/2018-06/24/content_5300953.htm)
5. Chen, Z. (2021). Application of environmental, ecological strategy in smart city space architecture planning. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101684. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101684>.

**Д.С. Черненко, Д.О. Яковенко**

*Компания БТУ-Центер, Киев, Украина*

*[chernenko@btu-center.com](mailto:chernenko@btu-center.com), [d.yakovenko@btu-center.com](mailto:d.yakovenko@btu-center.com)*

Компания «БТУ-Центер» — украинский производитель микробных и ферментных препаратов для сельского хозяйства. Среди продуктов – линейки для защиты и питания растений, оздоровления почв, биопрепараты для животноводства и др. Всего запатентовано более 60 биопрепаратов. Продукция компании разрешена к использованию в органическом земледелии, что подтверждается сертификатом Organic Standard.

Кроме Украины, где биопрепараты компании используют более чем на 4 млн га, преимущества предлагаемых биотехнологий уже оценили в странах СНГ (Россия, Казахстан, Киргизия, Молдова, пр.), Европы (страны Прибалтики, Германия, Болгария, Сербия и пр.)

В Беларуси в 2018 году были зарегистрированы три биопрепарата для растениеводства: биологический фунгицид Фитадапамога, микробиологическое удобрение Органик-Баланс, а также прилипатель Липосам. Ожидается получение регистрационного сертификата еще на 2 продукта – это Экостерн, деструктор растительных остатков, и Микофренд, микоризообразующий препарат.

Опираясь на четырехлетний опыт работы в почвенно-климатических условиях Беларуси, мы можем сказать – сельское хозяйство Беларуси имеет безграничный потенциал для биологизации производства продукции данной отрасли и это в свою очередь даст обоснования для увеличения площадей под органическое производство.

Нашей компанией проведено большое количество опытов в хозяйствах, научных институтах и опытных станциях Беларуси, в виду разных ситуаций в поле, а также для имеющегося практического опыта.

В условиях снижения плодородия почв, глобального изменения климата, засухи и перепадов температур для сельскохозяйственных производителей все более важным является поиск инструментов повышения урожайности и снижения рисков ее потерь от неблагоприятных факторов.

С одним из таких факторов в виде непредвиденных заморозков с 3 на 4 июня в Беларуси столкнулся филиал «Невель» ОАО «Пинский мясокомбинат» Брестской области. Предприятие в 2018 году делало особую ставку на кукурузу, однако в сложившихся условиях рассчитывать на хороший урожай было трудно.

Изучив состояние пострадавших от заморозка растений кукурузы и понимая возможности уже зарегистрированных в Беларуси биологических препаратов, мы приняли решение заложить промышленный опыт на 10 га кукурузы Энигма, возделываемой на супесчаной почве после многолетних трав. В фазу развития кукурузы 9-й лист использовали:

- микробиологическое удобрение Органик-Баланс 0,5 л/га (для оптимизации питания, стимуляции роста и снятия стресса),
- биологический фунгицид Фитадапамога 0,3 л/га (для профилактики заболевания ослабленных растений),
- прилипатель Липосам 0,25 л/га (для удержания препаратов на поверхности листа и продолжения эффективного действия).

Эффект препаратов усилил небольшой дождь, который прошел через несколько дней после обработки посевов.

Уже через три недели агроном хозяйства на поврежденном заморозком поле заметил первые отличия между растениями опытного и контрольного участков. Опытные растения преуспевали в развитии на 1 лист, имели более широкое основание и, что наиболее примечательно, наличие более развитой корневой системы. У большинства опытных растений развивалась вторая пара "воздушных" корней, которые улучшают снабжение растения влагой и питанием в условиях бедной и сухой почвы.

На протяжении всей последующей вегетации кукурузы наши специалисты несколько раз приезжали в хозяйство для отслеживания состояния опытных растений. В итоге специалисты также отметили увеличение среднего количества початков на одном растении в сравнении с контрольным участком.

В конце сентября был проведён учёт урожайности зеленой массы кукурузы. Результат показал, что урожайность кукурузы на опытном участке составила 10,82 т/га против 9,5 т/га на контрольном

ном. Таким образом, производственный опыт показал, что использование биопрепаратов для снятия стресса и профилактики грибных и бактериальных болезней на пострадавших от заморозка растений имеет положительный эффект. Прибыль от дополнительной урожайности составила около 200 \$/га, что примерно в 10 раз превышает стоимость рекомендуемого производителем комплекса биопрепаратов.

Неплохая инвестиция в урожай, учитывая также полную экологичность и безопасность биопрепаратов для окружающей среды и человека. Природе нужно идти навстречу и она не замедлит с положительным ответом.

В том же 2018 году были получены результаты опытов, в ООО «Здоровая страна» Гродненская область, Берестовицкий район, дер., Людвиново, по садоводству. Эту практику данное хозяйство поддерживает все последующие года.

Также, имеем опыты 2019 года с КФХ Лапишки-Агро. В данном хозяйстве мы испытывали препарат Компоназа, биопрепарат для ускоренного приготовления БИОкомпоста, на отходах грибоводства. Результатом опыта, был полностью завершённый процесс компостирования данного субстрата за 1,5 месяца. Также, собственник данного хозяйства отобрал образцы субстрата, опытного и контрольного, для проведения агрохимического анализа в независимой лаборатории. Исследования обеспечили нас показателям в сохранении азота и увеличенных показателях доступного фосфора и калия.

РУНП "Гродненский зональный институт растениеводства" НАН Беларуси, исследовал эффективность препаратов Экостерн и Микофренд в 2020года.

О биологической и хозяйственной эффективности микробиологического удобрения Микофренд в посевах озимой пшеницы и качестве урожая

Схема опыта:

1. Вариант деланки - контроль, без удобрений
2. Эталон – Органик-Баланс (семена – 1,5 л/т, внесение в почву – 1,0 л/га, некорневая подкормка – 0,5 л/га)
3. Микофренд (семена – 1,0 л/т, внесение в почву – 1,0 л/га, некорневая подкормка – 0,3 л/га)
4. Микофренд (семена – 6,0 л/т, внесение в почву – 3,0 л/га, некорневая подкормка – 2,0 л/га)

Таблица 1. – Влияние микробиологического удобрения МИКОФРЕНД на биохимические показатели зерна озимой пшеницы (полевой мелкоделяночный опыт, РУП «Гродненский зональный институт растениеводства НАН Беларуси», 2020 г.)

Варианты опыта	Содержание в зерне, %			
	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	белок
Контроль, без обработки	2,10	0,64	0,53	12,0
Эталон – Органик-Баланс (семена – 1,5 л/т, внесение в почву – 1,0 л/га, некорневая подкормка – 0,5 л/га)	2,09	0,65	0,55	12,4
Микофренд (семена – 1,0 л/т, внесение в почву – 1,0 л/га, некорневая подкормка – 0,3 л/га)	2,11	0,66	0,54	12,5
Микофренд (семена – 6,0 л/т, внесение в почву – 3,0 л/га, некорневая подкормка – 2,0 л/га)	2,11	0,65	0,53	12,6

Таблица 2. – Влияние микробиологического удобрения МИКОФРЕНД на урожайность озимой пшеницы (полевой мелкоделяночный опыт, РУП «Гродненский зональный институт растениеводства НАН Беларуси», 2020 г.)

Варианты опыта	Урожайность, ц/га	Прибавка к контролю, ц/га
Контроль, без обработки	41,5	-
Эталон – Органик-Баланс (семена – 1,5 л/т, внесение в почву – 1,0 л/га, некорневая подкормка – 0,5 л/га)	45,2	3,7
Микофренд (семена – 1,0 л/т, внесение в почву – 1,0 л/га, некорневая подкормка – 0,3 л/га)	47,3	5,8
Микофренд (семена – 6,0 л/т, внесение в почву – 3,0 л/га, некорневая подкормка – 2,0 л/га)	49,7	8,2
НСР <sub>05</sub>	3,45	

О биологической и хозяйственной эффективности микробиологического удобрения Экостерн в посадках картофеля и качестве урожая

Схема опыта:

1. Контроль, (без применения микробиологических удобрений)

2. Эталон: Органик-Баланс 1,5 (А) + 0,5 (В) л/га

3. исследуемое удобрение (с указанием норм расхода):

Экостерн 1,0 (А) + 0,5 (В) л/га;

Экостерн 3,0 (А) + 1,0 (В) л/га.

Сроки применения удобрений:

А – обработка стерни и пожнивных остатков (08.10.2019);

В – обработка после посадки картофеля, перед формированием гребня (27.5.2020 г.)

Таблица 3. – Хозяйственная эффективность применения микробиологического удобрения Экостерн на картофеле (полевой мелкоделяночный опыт, РУП «Гродненский зональный институт растениеводства НАН Беларуси», 2020 г.)

Вариант	Урожайность, т/га		+ к контролю, т/га	
	общая	товарная	общая	товарная
Контроль (без обработки)	28,0	23,0	-	-
Органик-баланс 1,5 (А) + 0,5 (В) л/га (эталон)	30,5	25,8	+2,5	+2,8
Экостерн 1,0 (А) + 0,5 (В) л/га	30,9	26,2	+2,9	+3,2
Экостерн 3,0 (А) + 1,0 (В) л/га	31,3	26,8	+3,3	+3,8
НСР <sub>05</sub>	1,78	1,14		

Микроорганизмы – это невидимый помощник производителя сельскохозяйственной продукции. Использование микробиологических препаратов не только повысит урожайность и качество продукции, а также сохранит здоровье почвы и человечества в целом.

УДК 628.316.12

### **ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА НАКОПЛЕНИЕ <sup>137</sup>Cs В БОБОВО-ЗЛАКОВЫХ ТРАВСТОЯХ НА ЗАГРЯНЁННЫХ РАДИОНУКЛИДАМИ ТОРФЯНЫХ ПОЧВАХ**

**А.В. Шашко**

*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, shashko.a@polessu.by*

**Введение.** Основная проблема кормопроизводства Республики Беларусь, требующая скорейшего решения, – несбалансированность кормов по белку. Недостаток белка в кормах приводит к нерациональному расходованию содержащихся в них углеводов, физическому перерасходу кор-

мов и, соответственно, удорожанию продукции животноводства. Из-за несбалансированности кормовых рационов по протеину в суточном кормовом балансе на 20 % недобор животноводческой продукции достигает 30–40 %, а себестоимость ее и расход кормов возрастают в 1,5 раза.

Многолетние травы являются не только источником получения ценных, высокопитательных кормов, богатых белком и витаминами, но и играют важную роль в сохранении и повышении плодородия почвы. В связи с этим для создания высокопродуктивных агроценозов длительного пользования необходимо использовать травосмеси на основе традиционных и малораспространенных бобовых и злаковых трав.

Смеси бобовых в сочетании со злаковыми травами при укосном использовании имеют ряд существенных преимуществ по сравнению с раздельными посевами этих же растений. По сравнению с раздельными посевами смеси позволяют иметь более высокую продуктивность. Урожайность раздельных посевов бобовых трав, таких как клевер луговой, люцерна, люцерна рогатый, галега восточная, находятся на уровне 8–9 т/га сухого вещества, тогда как их смеси, например с тимофеевкой, – 11–12 т/га, или более чем на 20% больше [1].

Использование ризобияльного азота бобовых позволяет получить урожайность сухой массы на 1 га, сходную с внесением 150–180 кг/га действующего вещества азотных удобрений. Бобово-злаковые травосмеси при укосном использовании при доле бобовых 70% и более позволяют обогащать азотом злаковые травы. Корм обогащается легко перевариваемыми углеводами благодаря включению в смеси злаковых трав, улучшается соотношение между концентрацией обменной энергией и протеином.

Скармливание кормов из бобово-злаковых смесей способствует улучшению поедаемости и увеличению удоев [2].

Относительно высокие уровни накопления радионуклидов в бобовых культурах ограничивают возможность их использования для производства кормов в зоне радиоактивного загрязнения. В связи с этим, в первые годы после катастрофы на Чернобыльской АЭС из полевых севооборотов были выведены люпин, горох, люцерна, клевер, вика и другие бобовые культуры. Это негативно отразилось на состоянии кормовой базы животноводства и сбалансированности кормов по элементам питания.

Выходом из сложившейся ситуации является производство кормов на основе многокомпонентных бобово-злаковых травосмесей. В эти травосмеси будут включены сорта бобовых и злаковых культур, которые в меньшей степени накапливают  $^{137}\text{Cs}$  из почвы.

Загрязненная радионуклидами территория характеризуется широким распространением торфяных почв. Основная часть осушенных торфяных массивов сосредоточена в регионе Белорусского Полесья, наиболее пострадавшем от чернобыльской катастрофы [3].

Проблема получения растениеводческой продукции, соответствующей допустимым уровням по содержанию  $^{137}\text{Cs}$ , на торфяных почвах остается актуальной до настоящего времени. Основная доля растениеводческой продукции и кормов, не отвечающих требованиям РДУ, производится именно на почвах данного типа. Для вышеуказанных почв установлены оптимальные дозы различных видов минеральных удобрений и известковых материалов, позволяющие снизить содержание  $^{137}\text{Cs}$  в травостое. Вместе с тем, многие вопросы использования защитных методов, приемов и средств до настоящего времени остаются невыясненными. Не достаточно изучено возделывание бобовых трав, особенно нетрадиционных на загрязненных радионуклидами торфяных почвах [4].

Исходя из этого, для увеличения продуктивности и качества сенокосов и эффективного развития всей отрасли кормопроизводства в загрязненных районах Брестской области необходимо обеспечить получение полноценных по зоотехническим требованиям и радиологическим нормам кормов на основе многокомпонентных бобово-злаковых смесей. Они сочетают высокую потенциальную продуктивность и качество кормов.

**Материалы и методы исследований.** Исследования с различными видами и дозами минеральных удобрений при возделывании бобово-злаковых травосмесей в условиях стационарных полевых экспериментов проводились в 2012-2014 гг. на торфяно-глеевой почве Черebasовской осушительно-увлажнительной мелиоративной системы (земли СПК «Новое Полесье» Лунинецкого района Брестской области. Агрохимические показатели почвы: зольность 28,4 %,  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  – 4,8,  $\text{P}_2\text{O}_5$  – 187 мг/кг;  $\text{K}_2\text{O}$  – 345 мг/кг;  $\text{CaO}$  – 1521 мг/кг;  $\text{MgO}$  – 128 мг/кг почвы. Плотность загрязнения  $^{137}\text{Cs}$  – 140 кБк/м<sup>2</sup> (3,8 Ки/км<sup>2</sup>).

Минеральные удобрения в виде суперфосфата аммонизированного, калия хлористого и аммиачной селитры вносились в соответствии со схемой полевого эксперимента.

Таблица 1. – Варианты применения минеральных удобрений в опыте

Варианты опыта	Дозы удобрений под I укос, кг/га д.в.			Дозы удобрений под II укос, кг/га д.в.		
	N	P	K	N	P	K
1. Контроль	-	-	-	-	-	-
2. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	-	60	135	-	-	45
3. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> + м/э	-	60	135	-	-	45
4. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	22,5	60	135	7,5	-	45
5. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	22,5	60	135	7,5	-	45
6. N <sub>60</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	45	60	135	15	-	45

Фосфорные удобрения вносились в полной дозе под первый укос, калийные и азотные – 75 % под первый укос и 25 % под второй укос, микроудобрения в виде внекорневой подкормки (сульфат меди, молибденовокислый аммоний, борная кислота). из расчета Cu -100 г д.в./га, Mo - 50 г д.в./га и B - 50 г д.в.

Испытывались три вида травосмесей: 1 – тимофеевка луговая (*Pleum pratense*), кострец безостый (*Bromopsis inermis Holub*), овсяница луговая (*Fesuca pratensis*), лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus L.*); 2 – тимофеевка луговая (*Pleum pratense*), кострец безостый (*Bromopsis inermis Holub*), овсяница луговая (*Fesuca pratensis*), клевер луговой (*Trifolium pratense L.*), клевер гибридный (*Trifolium hybridum L.*); 3 – тимофеевка луговая (*Pleum pratense*), кострец безостый (*Bromopsis inermis Holub*), овсяница луговая (*Fesuca pratensis*), галега восточная (*Galega orientalis L.*).

Посев травосмесей беспокровный, повторность опытов 3-кратная, размещение делянок рендомизированное. Норма высева культур соответствовала технологии их возделывания на торфяных почвах. Сроки отбора растительных и почвенных образцов были приурочены к проведению отчуждения травостоев.

Таблица 2. – Удельная активность <sup>137</sup>Cs в сене многолетних бобово-злаковых травах (2011-2014 гг.), Бк/кг

Варианты опыта	2012 г.		2013 г.		2014 г.	
	1-й укос	2-й укос	1-й укос	2-й укос	1-й укос	2-й укос
Лядвенец рогатый+ овсяница тростниковидная+кострец безостый+тимофеевка луговая						
1. Контроль	67,8±23,2	87,8±26,2	78,0±23,4	96,1±28,8	39,4±11,8	173,4±52,0
2. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	45,4±14,1	76,1±22,4	56,3±16,9	71,6±21,4	32,1±9,6	89,5±26,8
3. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> + м/э	34,3±12,8	48,5±14,8	37,6±11,1	62,4±18,7	26,7±9,7	86,8±28,2
4. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	32,4±12,6	44,9±14,7	29,3±9,1	38,8±11,9	27,4±8,3	61,4±18,4
5. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	26,8±9,8	48,9±14,8	16,8±5,2	27,2±8,1	21,7±6,6	40,4±12,1
6. N <sub>60</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	17,3±5,9	27,9±9,4	20,2±5,9	23,2±6,9	27,9±8,3	54,2±16,2
Клевер луговой+ клевер гибридный+ овсяница тростниковидная+кострец безостый+тимофеевка луговая						
1. Контроль	70,8±24,5	99,5±31,0	66,7±19,9	138,1±41,2	63,6±18,9	128,0±38,4
2. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	46,6±16,4	74,3±21,4	47,3±14,3	108,8±32,6	33,0±9,9	129,0±38,7
3. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> + м/э	19,6±8,7	62,3±19,3	32,3±9,6	70,6±21,2	25,2±7,6	138,9±41,7
4. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	16,5±6,7	46,7±14,1	21,7±6,4	56,9±17,1	22,4±6,6	118,6±35,5
5. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	15,8±5,6	54,8±16,3	24,7±7,4	43,2±12,9	26,6±7,9	63,1±17,8
6. N <sub>60</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	12,8±4,4	50,6±15,1	14,3±4,3	36,9±11,1	19,4±5,7	47,5±14,1
Галега восточная + овсяница тростниковидная+кострец безостый+тимофеевка луговая						
1. Контроль	48,58±17,2	81,8±23,7	66,0±19,4	86,8±26,0	31,09±9,3	242,42±72,7
2. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	33,49±10,9	50,0±15,5	34,3±10,2	77,6±23,2	25,3±6,8	147,5±44,3
3. P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> + м/э	24,08±9,2	42,9±13,6	35,0±10,5	64,8±19,4	19,6±5,8	97,5±29,3
4. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub>	18,0±7,1	31,4±9,8	32,0±9,7	56,0±16,8	16,4±4,9	71,5±21,4
5. N <sub>30</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	13,9±6,4	29,4±9,3	14,2±4,2	50,4±15,1	16,6±4,9	78,9±23,6
6. N <sub>60</sub> P <sub>60</sub> K <sub>180</sub> +м/э	12,4±5,6	41,6±12,5	15,6±4,5	44,2±13,3	13,8±4,1	53,9±16,1

За годы исследований метеорологические условия вегетационных периодов различались. По степени увлажнения 2012 и 2014 гг. можно отнести к годам с нормальным увлажнением (ГТК составили 1,5 и 1,4 соответственно), 2013 г. отличался избыточной увлажненностью (ГТК равен 2,1). Избыточной увлажненностью отличался май 2014 года (ГТК 2,2).

**Результаты и обсуждение.** Для территорий загрязненных  $^{137}\text{Cs}$ , важной составляющей качества производимых травяных кормов является снижение его удельной активности. Поступление  $^{137}\text{Cs}$  в товарную продукцию зависит от многих факторов, в том числе уровней азотного и калийного питания, метеорологических условий вегетационных периодов, количества и качества проводимых укосов.

Накопление радионуклида в сене различалось по годам исследований и по укосам. Наибольшая удельная активность  $^{137}\text{Cs}$  в сене многолетних бобово-злаковых трав была в 2014 году во втором укосе по всем видам травосмесей. Это связано, прежде всего, с агрометеорологическими условиями, сложившимися в период вегетации трав. Как следует из таблицы 2, параметры перехода  $^{137}\text{Cs}$  из почвы в растения в первом укосе значительно ниже, чем во втором.

Согласно данным таблицы 2 на контроле (без применения удобрений) накопление  $^{137}\text{Cs}$  в сене испытуемых травосмесей в среднем по годам в 1,3-1,5 раза выше, чем в вариантах с применением фосфорных и калийных удобрений ( $\text{P}_{60}\text{K}_{180}$ ). Внесение азота в дозе 30 кг/га д.в. на фоне  $\text{P}_{60}\text{K}_{180}$  способствовало снижению накопления  $^{137}\text{Cs}$  в сене в среднем в 1,6 раза. Применение полной дозы удобрений ( $\text{N}_{60}\text{P}_{60}\text{K}_{180} + \text{Cu}_{100} + \text{Mo}_{50} + \text{V}_{50}$ ) снижало накопление  $^{137}\text{Cs}$  в сене в 2- 2,4 раза по сравнению с вариантом  $\text{P}_{60}\text{K}_{180}$  и до 3 раз по сравнению с вариантом без внесения удобрений. По всем годам испытаний, максимальный переход  $^{137}\text{Cs}$  в урожай сена наблюдался в травосмеси злаковых многолетних трав с клеверами луговым и гибридным.

**Заключение.** Таким образом, на торфяно-глеевой почве с уровнем загрязнения радионуклидами  $^{137}\text{Cs}$  1 – 5 Ки/км<sup>2</sup> для производства сена, при использовании его для получения продукции животноводства в пределах республиканских допустимых уровней содержания  $^{137}\text{Cs}$  наиболее эффективными дозами минеральных удобрений, снижающими накопление  $^{137}\text{Cs}$  в урожае многокомпонентных бобово-злаковых смесей, рекомендуются варианты внесения удобрений  $\text{N}_{30-60}\text{P}_{60}\text{K}_{180}$  и внесение микроудобрений  $\text{Cu}_{100} + \text{Mo}_{50} + \text{V}_{50}$ .

#### Список использованных источников

1. Кукреш, Л. В. Сбалансированный белком корм – залог высокой экономической эффективности животноводства / Л. В. Кукреш, И. В. Рышкель // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. - 2009. - N 1. - С. 62-66.
2. Экономическое обоснование формирования и снижения себестоимости продукции животноводства и кормов / В. Г. Гусаков [и др.] ; рец.: В. Ф. Бондарчук, Н. И. Соловцов; Институт аграрной экономики Национальной академии наук Беларуси. – Минск, 2003. – 58 с.
3. Мееровский, А.С. Проблемы использования и сохранения торфяных почв / А.С. Мееровский, В.П. Трибис // Новости науки и технологий. – 2012. – №4 (23). – С. 3–9.
4. Рекомендации по ведению агропромышленного производства в условиях радиоактивного загрязнения земель Республики Беларусь на 2012-2016 годы. – Минск, 2012. – 121 с.

УДК 628.3:621.3

### ПРИКЛАДНЫЕ ЗАДАЧИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ВОДООЧИСТКИ С УЧЁТОМ КРИТЕРИЕВ ЭКОЛОГО-РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТИ

В.Н. Штепа<sup>1</sup>, Н.А. Заец<sup>2</sup>, Д.Г. Алексеевский<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

<sup>2</sup>Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

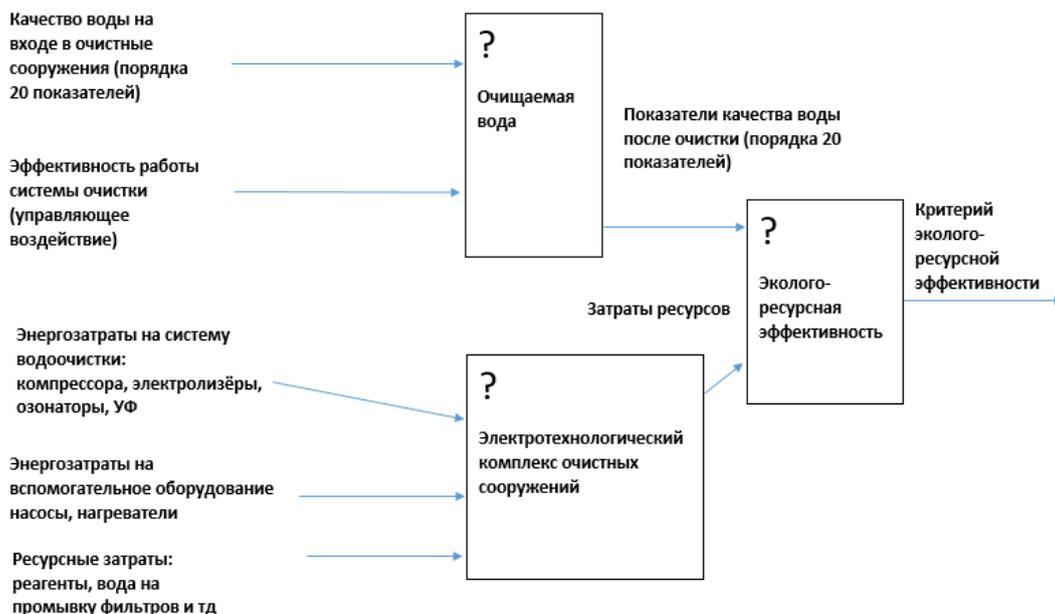
<sup>3</sup>Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина

[tppoless@gmail.com](mailto:tppoless@gmail.com)

В результате отсутствия комплексного эколого-ресурсного подхода стоимость удаления загрязнителей из 1 м<sup>3</sup> сточных вод колеблется в широких пределах и зависит от параметров воды, подаваемой на установки, функционала такого оборудования и требований к её показателям качества (повторное использование, сброс в природные водоемы или канализацию, другие каналы водоотведения) [1-4]. При этом есть факторы, которые вызывают риски значительного увеличения

техногенной нагрузки на окружающую среду и затрудняют управление экологической безопасностью технологий водоочистки [5, 6]: возможность действия непредсказуемых чрезвычайных ситуаций (ЧС) природного и техногенного происхождения; отсутствие полноты информации о конкретных комбинированных процессах водоочистки (каждый объект имеет свои особенности и параметры настройки оборудования для эффективного функционирования); многофакторность характеристик процессов; отсутствие измерительного оборудования показателей качества сточных вод способного работать в режиме реального времени (РРВ) или низкая точность и быстродействие таких технических решений.

Соответственно, задача создания методов объединения в единый информационно-управляющий комплекс систем водоотведения и очистки сточных вод на основе эколого-ресурсных (энергоэффективных) критериев является актуальной научно-практической задачей (рис. 1).

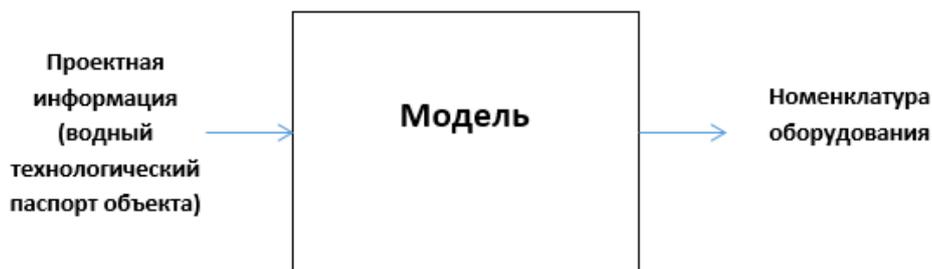


**Рисунок 1. – Обобщённая структурная модель реализации процессов водоочистки на основе эколого-ресурсного подхода**

При этом к эффективным подходам оценки проблемных областей, характеризующихся размытостью информации, большим количеством технологических параметров и постоянным действием непредвиденных возмущающих факторов, является построение моделей таких процессов с использованием систем искусственного интеллекта [5].

При этом основные задачи, решаемые при помощи моделирования на этапе проектирования, следующие:

- Выбор схемы (номенклатуры) системы водоочистки:

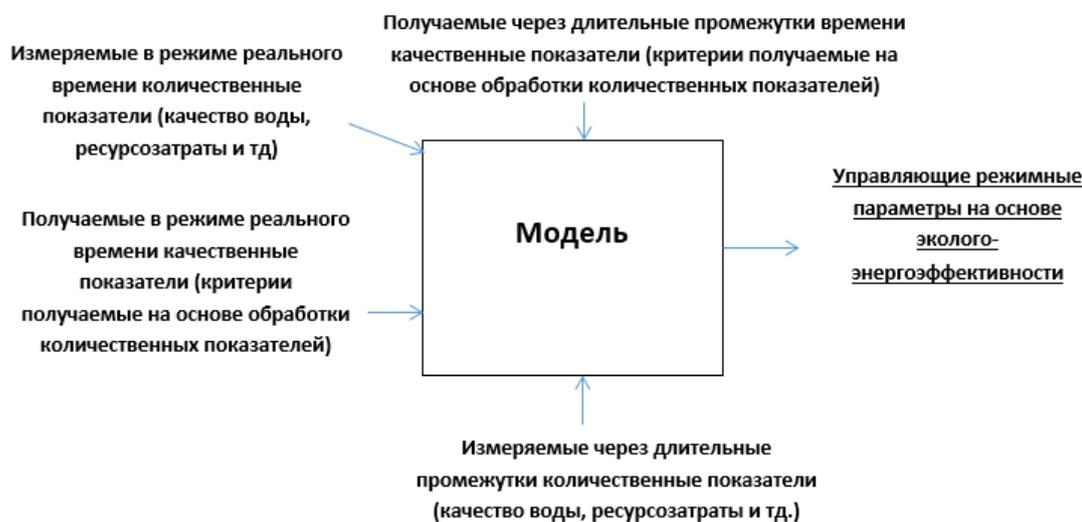


- Выбор режимов работы системы водоочистки:



Соответственно, после реализации этапа проектирования возникает задача создания систем управления комбинированными сооружениями водоочистки (режим РРВ). В современных условиях основные процессы в такой системе должны быть автоматизированы (синтез автоматической системы управления (АСУ)).

При этом в процедуре разработки АСУ первым базовым этапом является также разработка математической модели объекта управления (ОУ). Тогда адаптивное управление системой водоочистки в режиме реального времени можно представить, как процесс обработки в РРВ количественных и качественных параметров комбинированных процессов редукции загрязнителей из водных растворов:



С учётом сложности синтеза на начальном этапе адаптивной АСУ способной работать в РРВ, как стартовый (промежуточный) этап предлагается апробировать комплексную математическую модель создав на её основе систему поддержки принятия решений (СППР) управления процессами водоочистки (рис. 2).

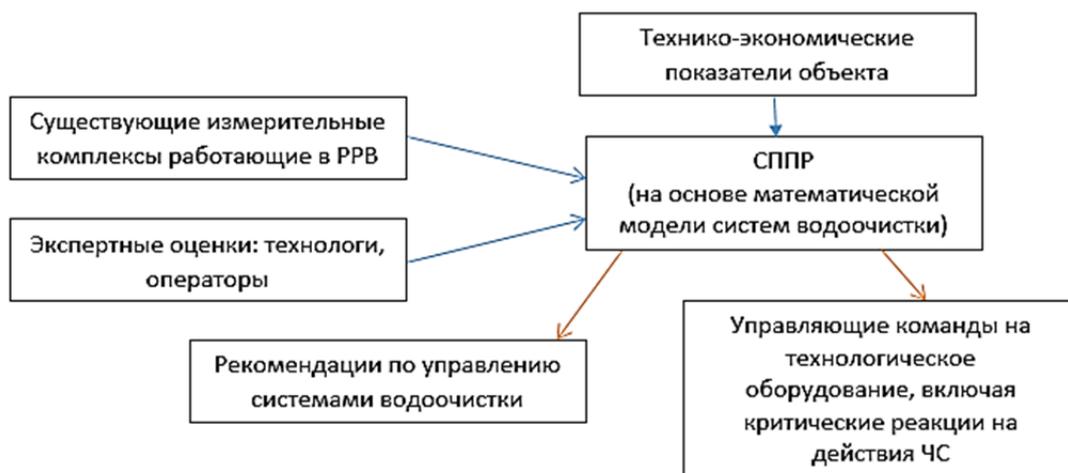


Рисунок 2. – Интеграция СППР (на основе комплексной математической модели) в функционал очистных сооружений

**Выводы и задачи дальнейших исследований.** Использование глобальных эколого-ресурсных критериев (например, критерия жизнеспособности активного ила биологических процессов удаления загрязнителей) связанных с целью управления, как формой разрешения глобальной проблемы автоматизации очистных сооружений, в качестве инструмента формализации математических моделей, позволит создать соответствующую систему поддержки принятия решений с функционалом оперативного регулирования и тактического прогнозирования даже в условиях чрезвычайных ситуаций.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на создание математических моделей и проверки их адекватности (технологического соответствия) с последующим синтезом адаптивных АСУ способных работать в РРВ, включая промежуточный этап разработки СППР.

#### **Список использованных источников**

1. Мазоренко Д. І., Цапко В. Г., Гончаров Ф. І. Інженерна екологія сільськогосподарського виробництва. – К.: Знання, 2006 – 376 с.

2. Гришин, Б. М. Удаление соединений азота из сточных вод с применением окислителей / Б. М. Гришин, А. Н. Кошев, Н. Н. Ласьков, М. В. Бикунова // Региональная архитектура и строительство. – 2013. № 2.

3. Долина Л.Ф. Проектирование станции очистки сточных вод населенного пункта. – Днепропетровск: Стандарт. 2002. – с. 144.

4. Волков СВ., Костюченко СВ. и др. Обеззараживание сточных вод УФ-излучением. Водоснабжение и сантехника. – 2000. – №11. – с. 11 – 13.

5. Штепа В. Н. Концепция управления оборудованием водоочистки с учетом доминирующего загрязнителя / В. Н. Штепа, А. П. Левчук // Агропанорама: научно-технический журнал. – 2018. – № 5. – С. 33-38.

6. Штепа В. М. Обґрунтування та розробка критерію енергоефективності функціонування електротехнологічних систем водопідготовки / В. М. Штепа, Ф. І. Гончаров, М. А. Сироватка // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Техніка та енергетика АПК: збірник наукових праць. – Київ: НУБіПУ, 2011. – Вип. 161. – С. 187–193.

## СОДЕРЖАНИЕ

### ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

<b>Воробьева М.М., Пошелюк А.Д.</b> ДНК-паспортизация некоторых редких видов растений фауны Беларуси.....	4
<b>Вороненко А.А., Пирог Т.П.</b> Энергетические и биохимические аспекты синтеза микробного полисахарида этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла.....	8
<b>Гречко В.М., Чещевик В.Т., Sykula A., Dzeikala A., Lodyga-Chruscinska E.</b> Влияние комплекса металла (меди) с гесперетином на активность АВС-транспортеров в клетках <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
<b>Густова Д.С.</b> Обзор изменений, вносимых в гармонизированную систему описания и кодирования товаров с 1 января 2022 года.....	13
<b>Дитченко Т.И., Комарова В.А., Гудель В.С.</b> Влияние типа питательной среды на содержание фенолпропаноидов и флавоноидов в культурах клеток, тканей и органов <i>Echinacea purpurea</i> L. Moench.....	17
<b>Дрозд Е.В., Бабак О.Г., Некрашевич Н.А., Анисимова Н.В., Яцевич К.К., Кильчевский А.В.</b> Создание нового селекционного материала томата с высоким накоплением бета-каротина, комплексной устойчивостью к болезням и функциональной мужской стерильностью методами молекулярного маркирования признаков.....	19
<b>Жук О.Н., Слиж Д.А., Сакович В.В.</b> Влияние brassinosterоидов на протеолитическую активность культуральной жидкости и экстракта мицелия вешенки обыкновенной.....	23
<b>Иванов Н.С., Ярова А.А., Пирог Т.П.</b> Влияние конкурентных микроорганизмов на биологическую активность поверхностно-активных веществ <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ИМВ В-7241.....	26
<b>Кульгавеня А.Д., Ильючик И.А., Никандров В.Н.</b> О протеиназах вешенки обыкновенной ( <i>Pleurotus ostreatus</i> ).....	29
<b>Лагуновская Е.В.</b> Влияние аллелей SSR локусов на отзывчивость в культуре пыльников <i>in vitro</i> у генотипов тритикале.....	32
<b>Слиж Д.А., Жук О.Н.</b> Рост и развитие глубоинной культуры <i>Stereum hirsutum</i> : влияние brassinosterоидов.....	37
<b>Страпко К.С., Слиж Д.А., Жук О.Н.</b> Антиоксидантный статус шампиньона двуспорового.....	39
<b>Суховеева С.В., Кабачевская Е.М., Вологовский И.Д.</b> Седиментация амилопластов в клетках черешков верхушечных листьев растений томата при действии гравистимуляции... ..	42
<b>Цапко С.А., Красинько В.О.</b> Киллерная активность дрожжей, выделенных из растительного сырья.....	46

### БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

#### БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АКВАКУЛЬТУРЫ

<b>Акулович А.А., Воробьева М.М.</b> Оценка органолептических и физико-химических показателей пшеничной муки (предварительные результаты).....	49
<b>Безрученко Н.Н., Тыновец С.В., Макаревич М.А., Полешко Н.Н.</b> Использование биологических препаратов Фунгилекс и Фитоспорин-М против антракноза голубики высокорослой.....	51
<b>Буйнич Т.В., Натынчик Т.М.</b> Микробиологические исследования качества рыбопродуктов.....	55
<b>Волкова Е.М., Карат С.Б.</b> Репродуктивная способность самцов лабораторных мышей в условиях стресса и способы ее коррекции.....	57
<b>Волянчук Н.Н., Жук О.Н.</b> Анализ морфологических и биохимических показателей дрожжей винограда культурного.....	61
<b>Головнева Н.А., Рябая Н.Е., Морозова А.Н., Самарцев А.А., Михалюк А.Н.</b> Кормовая добавка на основе пропионовокислых бактерий для коррекции рубцового пищеварения....	65
<b>Дайнеко Н.М., Концевая И.И., Тимофеев С.Ф., Бондарева А.В.</b> Влияние микробных биопрепаратов на численность аммонифицирующих бактерий при возделывании озимой ржи.....	68

<b>Дмитрович Н.П., Козлова Т.В., Козлов А.И., Кузнецов Н.А.</b> Совершенствование рецептуры комбикормов для клариевого сома ( <i>Clarias gariepinus</i> Burchell) путем введения суспензии хлореллы и жмыхов масличных культур.....	70
<b>Ильючик И.А., Никандров В.Н.</b> Влияние хлорида марганца на физиолого-биохимическое состояние клеток <i>Chlorella vulgaris</i> штамма с 111 IBCE С-19.....	74
<b>Кароза С.Э.</b> Анализ рострегулирующей активности конъюгатов эпикастастерона с органическими кислотами на примере гречихи посевной ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.)...	79
<b>Козлова Т.В., Кузнецов Н.А., Козлов А.И., Дмитрович Н.П.</b> Продуценты Зельвенского водохранилища.....	84
<b>Курьянчик Т.Г., Козел Н.В.</b> Влияние почвенной засухи на содержание структурных белков фотосистем в листьях растений ячменя, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой.....	87
<b>Мороз И.В., Павлюк А.Н., Сапунова Л.И., Урбанчик Е.Н., Масальцева А.И.</b> Влияние энзиматической обработки на всхожесть и ферментативную активность семян рапса, овса и гороха.....	90
<b>Найденко И.А., Денисенко В.В., Сафонова М.Е.</b> Выделение молочнокислых бактерий из растительных источников.....	94
<b>Пицко Т.С., Коктыш И.В.</b> Свободный аминный азот как показатель оценки качества пивоваренной продукции.....	96
<b>Пластинина О.В., Сауткина Н.В., Прокулевич В.А.</b> Создание гибридных конструкций для получения главных антигенных доменов гликопротеина E2 вируса диареи крупного рогатого скота 2-го типа в составе фьюжн-белков в штаммах <i>Escherichia coli</i> .....	99
<b>Савина С.М., Дремук И.А., Емельянова А.В., Прищепчик Ю.В., Аверина Н.Г.</b> Влияние экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты на экспрессию структурных и регуляторных генов пути биосинтеза антоцианов в проростках озимой пшеницы.....	102
<b>Сапунова Л.И., Ерхова Л.В., Горбань В.В.</b> Пути повышения питательной ценности подсолнечного шрота.....	105
<b>Соколюк А.В., Василевская М.Е.</b> Молекулярно-генетическая характеристика плазмотипа у стабильных линий пшенично-ржаных амфидиплоидов различного происхождения.....	109
<b>Халак В.И.</b> Биохимические показатели сыворотки крови молодняка свиней как маркеры качественного состава мышечной ткани.....	111
<b>Халимончик Е.В., Епишко О.А., Юрага Н.М., Чебуранова Е.С.</b> Полиморфизм гена гормона роста у кур и петухов отечественной селекции.....	114
<b>Чернецкая А.Г., Малиновская Ю.В., Стригельская Н.П.</b> Пролиферативная активность земляники садовой ( <i>Fragaria ananassa</i> Duch.) сорта «Вима Занта».....	116

## МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

### АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

<b>Амазгбери Н.В., Семенкова Г.Н., Лисовская А.Г., Мельникова Е.А., Шадыро О.И.</b> Регуляция функций нейтрофилов 2-гексадеценалем.....	120
<b>Богданова А.В., Амазгбери Н.В., Семенкова Г.Н., Полешко А.Г., Квачева З.Б., Шадыро О.И.</b> 2-Гексадеценаль модифицирует функции дермальных фибробластов.....	124
<b>Волкова Е.М., Горбач А.А.</b> Анализ количественного содержания натрия хлорида и рН раствора изотонического для инфузий 9 мг/мл.....	127
<b>Герловский Д.О., Литвинко Н.М.</b> Активность гидролитических ферментов спермоплазмы при оценке потенциальной мужской инфертильности.....	130
<b>Денисов А.А., Поддубская О.Г., Волюнец Н.И., Кулагова Т.А., Кужир П.П., Токальчик Ю.П., Пашкевич С.Г., Губкин С.В.</b> Влияние субстрата на основе пиролитического углерода с наноразмерным рельефом на формирование нейронной сети..	132
<b>Коктыш И.В., Журко П.Т., Смолякова Р.М., Коктыш В.Т., Липницкий О.М.</b> Анализ экспрессии малых некодирующих РНК, ассоциированных с развитием остеоартритов.....	135
<b>Кондакова И.В., Какурина Г.В., Бахронов И.А., Черемисина О.В., Чойнзонов Е.Л.</b> Актин-связывающие белки системного кровотока: связь с прогрессией злокачественных новообразований.....	139

<b>Кулагова Т.А., Голубева Е.Н., Король Ю.Д., Борисов К.Н., Екимчик В.В., Корень С.В., Фомина Е.Г.</b> Взаимодействие графеновых квантовых точек с опухолевыми клетками.....	142
<b>Кулиш С.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г.</b> Поиск микробных протеиназ широкой субстратной специфичности.....	145
<b>Локутова О.В., Грицкевич Е.Р.</b> Антагонистическая активность пробиотических бактерий родов <i>Lactobacillus</i> и <i>Bifidobacterium</i> к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры человека.....	148
<b>Макаревич Д.А., Рябцева Т.В., Ковганко Н.Н., Штемплук Р.Г., Принькова Т.Н.</b> Гемосовместимость и адсорбционная способность иммобилизованных нанодисперсных алмазов.....	152
<b>Макаревич Д.А., Брюякин С.Д.</b> Моделирование и молекулярный докинг олигопептидов, связывающих компонент системы комплемента C1q.....	156
<b>Мальцева С.В., Якубович А.С., Грицкевич Е.Р.</b> Анализ биохимических свойств спорообразующих бактерий рода <i>Bacillus</i> .....	157
<b>Новицкий И.А., Амаэбери Н.В., Семенкова Г.Н., Шадыро О.И.</b> Влияние пальмитоксиацетона на функции лейкоцитов.....	160
<b>Подольский Д.Э., Чещевик В.Т.</b> Влияние ингибирования цитохром С-оксидазы на генерацию активных форм кислорода при активации тромбоцитов.....	163
<b>Рябцева Т.В., Таганович А.Д.</b> Специфичность сорбции провоспалительных цитокинов иммобилизованными олигопептидами.....	166
<b>Starovoitova S.</b> Probiotic's biotechnology for prevention and treatment of COVID-19.....	169
<b>Семенкова Г.Н., Адзерихо И.Э., Владимирская Т.Э., Серебро А.М., Амаэбери Н.В., Новицкий И.А., Шулганова А.В.</b> Особенности функционирования нейтрофилов у пациентов с легочной гипертензией.....	171
<b>Стубеда Н.А., Блоцкая Д.Н., Нефедов Л.И.</b> Аминокислоты и их дериваты в патогенезе атеросклероза.....	175
<b>Черней И.С., Широкова А.Н., Чещевик В.Т.</b> Определение оптимальных условий для культивирования <i>Candida spp.</i> .....	178
<b>Якубович А.С., Мальцева С.В., Грицкевич Е.Р.</b> Влияние условий культивирования бактерий рода <i>Proteus</i> на чувствительность к антибактериальным препаратам <i>in vitro</i> .....	181

## **НАУЧНЫЕ АСПЕКТЫ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭНЕРГОСБЕРЕЖЕНИЕ**

<b>Башилов А.В., Шутова А.Г., Седун Е.А., Войцеховская Е.А.</b> Устойчивость к засолению у видов перспективных для озеленения городских пространств.....	185
<b>Бойко В.В., Тыновец С.В., Володько Н.Г., Герасымик Д.В., Тыновец И.В.</b> Сохранение водных ресурсов при внедрении инновационных технологий профессионального орошения.....	188
<b>Воронич А.В., Штепа В.Н., Тыновец С.В.</b> Использование высокомолекулярных биологически активных соединений для интенсификации роста растений.....	190
<b>Гасанова И.И.</b> Формирование урожайности и качества зерна озимой пшеницы при ресурсосберегающей технологии выращивания в северной степи Украины.....	192
<b>Xiaolong Li, Lemiasheuski V., Mehmet Musa Özcan</b> Features of garbage recycling in nantun, jiangsu province, China.....	194
<b>Liu Jiu 'an, Lemiasheuski V., Ostrenko K., Ovcharova A.</b> Urban air pollution in hebei, China.....	196
<b>Liu Zhi gang, Ostrenko K., Ovcharova A., Lemiasheuski V.</b> Problems of control of stormwater runoff pollution in zhangjiakou city, hebi region.....	198
<b>Скороход І.С., Скрипчук П.М., Шпак Г.М.</b> Процесний підхід в оцінці економічної ефективності органічного виробництва.....	201
<b>Сахаревич Д.Ю., Паньков В.В., Шутова Т.Г.</b> Синтез металлорганического координационного полимера фумарата циркония для устройств сорбции водяного пара.....	204
<b>Tkachuk N., Zelena L., Krapuvnyi S., Podterher Y.</b> Phytotesting of toxicity of cultural fluid of bacteria <i>Bacillus velezensis</i> .....	208
<b>Тарасова Д.А., Совик Л.Е.</b> Проект фермы лесного садоводства в Бельгии.....	210
<b>Тыновец С.В., Филипенко В.С.</b> Проблемы экологической устойчивости белорусского Полесья.....	212
<b>Филипенко В.С., Тыновец С.В., Рубан Н.Н., Безрученок Н.Н.</b> Определение оптимальных размеров плантации промышленного производства голубики высокорослой как фактор.....	214

рационального использования природных ресурсов.....	
<b>Xu Yanhui, Lemiasheuski V.</b> Effects of anthropogenic factors on the geological environment of Shandong province.....	217
<b>Chen Pei, Bodilovskaya O.</b> Study of urban ecological environment in the process of urbanization.....	219
<b>Черненко Д.С., Яковенко Д.О.</b> Микробиология – основной работник в поле.....	224
<b>Шашко А.В.</b> Влияние минеральных удобрений на накопление <sup>137</sup> Cs в бобово-злаковых травостоях на загрязненных радионуклидами торфяных почвах.....	226
<b>Штепа В.Н., Заец Н.А., Алексеевский Д.Г.</b> Прикладные задачи моделирования процессов водоочистки с учетом критериев эколого-ресурсоэффективности.....	229

Научное издание

**СБОРНИК**  
**материалов V международной**  
**научно–практической *online-offline* конференции**  
**«БИОТЕХНОЛОГИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»**

**Полесский государственный университет,**  
**г. Пинск, Республика Беларусь,**  
**25–26 ноября 2021 г.**

За содержание и достоверность информации  
в материалах сборника отвечают авторы

Подписано в печать 16.11.2021. Бумага типографская  
Формат 60x84/8 Гарнитура Times  
Усл. печ. л. 27,55. Уч.–изд. л. 19,73. Тираж 50. Заказ № 269.

Отпечатано в учреждении образования «Полесский государственный университет»  
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23