

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ХАБАРШЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL BIOLOGY

№3 (92)

Алматы
“Қазақ университеті”
2022



KazNU Science • ҚазҰУ Ғылымы • Наука КазНУ

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №3 (92) қыркүйек



04.05.2017 ж. Қазақстан Республикасының Ақпарат және коммуникация министрлігінде тіркелген

Куәлік № 16494-Ж

*Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады
(наурыз, маусым, қыркүйек, желтоқсан)*

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Сапарғалиева Н.С., б.ғ.к. (Қазақстан)
e-mail: bb.kaznu.kz@gmail.com

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

Бисенбаев А.Қ., б.ғ.д., ҚР ҰҒА академигі (ғылыми редактор) (Қазақстан)
Бекманов Б.О., б.ғ.к., доцент (ғылыми редактордың орынбасары) (Қазақстан)
Төлеуханов С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Айташева З.Г., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Кистаубаева А.С., б.ғ.к. (Қазақстан)
Конусбаева А.С., PhD, профессор (Қазақстан)
Мухитдинов Н.М., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Нуртазин С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Турусбеков Е.К., б.ғ.к., қауымдастырылған профессор (Қазақстан)

Беркимбаев Р.И., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Искаков Б.К., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)
Сарбасов Д., PhD, профессор (АҚШ)
Орынбаева З., PhD, профессор (АҚШ)
Курмашева Р.Т., PhD (АҚШ)
Сапарбаев М., PhD, профессор (Франция)
Ищенко А., PhD (Франция)
Лось Д., б.ғ.д., профессор (Ресей)
Ташев А.Н., профессор (Болгария)
Құрманғалиев Е., PhD (США)

ТЕХНИКАЛЫҚ ХАТШЫ

Смекинов Изат, PhD (Қазақстан)

Журнал материалдарында ауқымды биологиялық мәселелері – ғылыми шолу, теориялық және эксперименталдық зерттеулердің нәтижелері қарастырылады.

Мақалалар биологияның келесі бөлімдері бойынша жарияланады: ботаника, биотехнология, биохимия, өсімдіктер физиологиясы, генетика және молекулалық биология, клеткалық биология, биофизика, адам және жануарлар физиологиясы, зоология және ихтиология, цитология және гистология, микробиология және вирусология.



Комитет по обеспечению качества
в сфере образования и науки
МОН РК



РОССИЙСКИЙ ИНДЕКС
НАУЧНОГО ЦИТИРОВАНИЯ
Science Index



Жоба менеджері

Гүлмира Шаккозова
Телефон: +7 701 724 2911
E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

Редакторлары:

Гүлмира Бекбердиева
Агила Хасанқызы

Компьютерде беттеген

Айгүл Алдашева

ИБ № 14804

Пішімі 60x84/16. Көлемі 15,75 б.т. Тапсырыс №16390.
Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің
“Қазақ университеті” баспа үйі.
050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.
“Қазақ университеті” баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2022

ШОЛУ МАҚАЛАСЫ



REVIEW ARTICLES



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

A.K. Shametov University of Minnesota, USA, Minnesota, Saint Paul
e-mail: shame012@umn.edu

THE IMPACTS OF HEAVY METALS ON THE GUT MICROBIOME IN COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*)

Pollution of freshwaters with heavy metals has become an acute problem in many countries including Kazakhstan, and industrial progress is the primary source of toxic heavy metals. Since gut microbe communities play a significant role in fishes' homeostasis, immune regulation, metabolism, and disease resistance, it is crucial to understand how heavy metals affect fish's gastrointestinal microbiome diversity. Applications of metagenomics using the 16S rDNA gene's hypervariable regions allow researchers to sequence the gastrointestinal microbiota's genome and identify the diversity of microorganisms, including those that cannot be cultured with traditional microbiological methods. Common carp (*Cyprinus carpio*) is resistant to highly polluted freshwaters with heavy metals and considered a bioindicator of freshwater pollution. Thus, this paper aims to overview heavy metals' influence on the gastrointestinal microbiome diversity in common carp. Future directions are also discussed to enhance our understanding about the relationships between different environmental factors and gut microbiome diversity of wild fish. Further, it is crucial to understand how each bacterium would help common carp resist heavy metal toxicity.

Key words: common carp, heavy metal, resistance, gut microbiome, metagenomics.

А.К. Шаметов

Миннесота Университеті, АҚШ, Миннесота, Сент-Поль қ.
e-mail: shame012@umn.edu

Сазан балығының (*Cyprinus carpio*) ішек микрофлорасына ауыр металдардың әсері

Тұщы сулардың ауыр металдармен ластануы көптеген елдерде, соның ішінде Қазақстанда да өте өзекті мәселеге айналды. Өндірістің қарқынды дамуы ауыр металдармен ластанудың басты көзі болып саналады. Ішек микрофлорасы балықтардың гомеостазында, иммундық жүйесін реттеуде, зат алмасу үдерісінде және ауруларға төзімділігінде маңызды қызмет атқарғандықтан, ауыр металдардың балықтардың ішек микрофлорасының алуантүрлілігіне әсерін зерттеу өте қажет. 16S рДНК генінің гиперөзгермелі аймақтары негізінде жүзеге асырылатын метагеномика әдісі зерттеушілерге ішек микрофлорасы геномын секвенирлеуге мүмкіндік береді. Нәтижесінде дәстүрлі микробиологиялық әдістер арқылы анықталынбайтын микроағзалардың тізімін анықтауға болады. Қарапайым тұқы немесе сазан балығы (*Cyprinus carpio*) ауыр металдармен қатты ластанған тұщы суларда өте төзімді және тұщы сулардың ластануының биоиндикаторы болып саналады. Сондықтан осы мақаланың мақсаты сазан балығы ішек микрофлорасының алуантүрлілігіне ауыр металдардың әсеріне шолу жасау. Табиғи ортадағы сазан балығы микрофлорасының алуантүрлілігі мен әртүрлі қоршаған орта факторлары арасындағы қарым-қатынасы туралы біздің білімімізді толықтыруға алып келетін бағыт талқыланады. Сонымен қатар, ауыр металдардың улылығына сазанның төзімділігіне оң әсер ететін бактериялар түрлерін білу өте маңызды.

Түйін сөздер: сазан, ауыр металдар, резистенттілік, ішек микрофлорасы, метагеномика.

А.К. Шаметов

Университет Миннесоты, США, Миннесота, г. Сент-Поль
e-mail: shame012@umn.edu

Воздействие тяжелых металлов на микробиом кишечника сазана (*Cyprinus carpio*)

Загрязнение пресных вод тяжелыми металлами стало острой проблемой во многих странах, в том числе и в Казахстане, а промышленный прогресс является основным источником токсичных тяжелых металлов. Поскольку сообщества кишечных микроорганизмов играют важную роль в гомеостазе, иммунной регуляции, метаболизме и устойчивости к болезням рыб, крайне важно

понять, как тяжелые металлы влияют на разнообразие микробиома желудочно-кишечного тракта рыб. Применение метагеномики с использованием гипервариабельных областей гена 16S рДНК позволяет исследователям секвенировать геном микробиоты желудочно-кишечного тракта и идентифицировать разнообразие микроорганизмов, включая те, которые невозможно культивировать традиционными микробиологическими методами. Обыкновенный карп или сазан (*Cyprinus carpio*) устойчив к сильно загрязненным тяжелыми металлами пресным водам и считается биоиндикатором загрязнения пресных вод. Поэтому целью данной статьи является рассмотрение влияния тяжелых металлов на разнообразие кишечной микрофлоры карповых рыб. Обсуждается способ расширения наших знаний о разнообразии микрофлоры карпа в естественной среде и взаимосвязи между различными факторами среды.

Кроме того, очень важно знать виды бактерий, положительно влияющие на устойчивость карпа к токсичности тяжелых металлов.

Ключевые слова: сазан, тяжелые металлы, резистентность, микробиом кишечника, метагеномика.

Introduction

Heavy metals are naturally occurring elements with high atomic weights. Many of them are essential for living organisms, mostly at lower concentrations [1]. Nevertheless, high concentrations of heavy metals can be toxic to living organisms, including freshwater fish; even traces of some heavy metals can have toxic effects. Since fish are the top consumers in freshwaters, heavy metals accumulate in different fish tissues through the food chain and directly from the contaminated aquatic environment. Human activities are the primary sources of heavy metal pollution [2, 3]; their toxic effects on the fish and other vertebrates are well-studied [4-6]. High concentrations of heavy metals caused histopathological damages in the gill structure of common carp (*Cyprinus carpio*) compared to control groups; damages included fusion of primary lamella and thinning and shortening secondary lamella [7]. Moreover, heavy metals exposure resulted in glomerular necrosis, congestion, and degeneration of tubules in the kidney of common carp [7]. However, little is known to scientists about the impacts of different heavy metals on fishes' gut microbiome composition.

Fish gastrointestinal microbiome, the collection of all microbes living on the gut's surface, has enormous impacts on the host metabolism, nutrient absorption, immune system regulations, and pathogen resistance. Gut microbiome diversity of fish considerably varies depending on their phylogenetics, surrounding environment, and diet [8-10]. Understanding the dynamics of the gut microbiome diversity of fishes caused by heavy metals is vital to maintain the health and disease resistance of economically important fish species. It is practically impossible to manipulate wild fish's

gastrointestinal microbiome composition in rivers and lakes where pollution usually occurs. Thus, preventing freshwaters from heavy metal pollution could be a better solution to protect fish and other aquatic organisms from heavy metals' toxicity. However, growing human populations in the world can make it challenging to regulate heavy metals concentrations in freshwaters because it can increase human pressures on wildlife habitats. Due to these limitations, it is crucial to estimate the concentrations of heavy metals that can alter the gut microbiome composition of fish, and especially, identify the gut microbiome's compositions associated with the toxicity of heavy metals. Further, specific gut microbiome communities associated with the heavy metal pollution might be better indicators of heavy metal exposure in fish. However, traditional microbiological methods cannot identify the entire microbiome diversity of environmental samples collected directly from different environments [11].

Thanks to achievements in genome sequencing techniques, scientists can study the biodiversity of microorganisms, including those which cannot be cultured using microbiological techniques, by sequencing the entire genome or desired regions of the genome using single-stranded nucleotide primers. Metagenomics, as a young branch of genomics, allow researchers to sequence the whole genome of microorganisms sampled from the environment and understand how their diversity in the gut varies depending on endogenous and exogenous factors [12-14]. Furthermore, PCR-based studies can amplify targeted regions of 16S rRNA of unculturable microorganisms using DNA primers [6], including vertebrates' gut microbiome. The bacterial rRNA gene has conserved and variable sequence regions, and each region can have its importance in genomic studies depending

on the aim of the research. Variable regions of the 16S rRNA gene can help identify microorganisms down to genera level [15, 16] because the sequences of these regions differ across microorganism species. Thus, primers designed based on highly variable 16S rDNA regions are applied to identify operational taxonomic units (OTU). OTUs are a group of microorganisms that share at least 97-99% identical sequences of the 16S rDNA gene [17-19]. These species can be considered as phylogenetically close relatives if a 16S rRNA (rDNA) sequence of OTUs differ by less than 1% [18] or 3% [19] across identified species. Fish that consume relatively similar food resources might share the same OTUs. However, OUT composition can vary considerably among fish species depending on their guilds and digestive system morphology, physiological behavior [20]. However, the existence of the core gut microbiome across fish species is required further investigation.

Since the gut microbiome communities of fish affect physiological and biochemical homeostasis and disease resistance of fish, it is essential to understand how their diversity will change after exposure to heavy metals. Obtained results would be beneficial for future studies on each operational taxonomic unit's roles in common carp's ability to live in heavily polluted waters with heavy metals. Thus, this paper aims to overview heavy metals' influence on the gastrointestinal microbiome diversity in common carp. Because gut metagenomics is a recent field, there are relatively few studies available. Therefore, I will describe each in detail and follow with recommendations for future studies.

Common carp is an economically significant cyprinid (*Cyprinidae*) species, and it generated 7.7 % of total aquaculture production in the world in 2018 (SOFIA, 2020). Moreover, common carp is highly resistant to polluted waters with heavy metals [21], and it is an interest of this study how the diversity of the gut microbiome changes because of heavy metal pollution. The gut microbiome diversity of common carp was thoroughly described in one study [8]. This paper compared the fecal microbiome diversity of three carp species captured from wild and laboratory-housed using the V6 hypervariable region of the 16S ribosomal RNA (rRNA). They found that *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Fusobacteria* were the most abundant phyla among studied species and their habitats. However,

there were significant differences between wild and laboratory-housed groups regarding the beta diversity within the species. Wild captured common carp had significantly higher amounts of *Clostridiales* than laboratory-housed common carp, whereas the abundance of *Fucobacteriales* was higher among laboratory-housed samples of the same species. Bacterial communities clustered by the environment of fish underlying the importance of the environment in shaping the gut microbiome composition of fishes. However, these authors did not find the significant effects of diet on the fecal microbiome diversity in common carp.

Applications of metagenomics in studying gastrointestinal microbiome diversity

In one experimental study [22], the authors randomly assigned juvenile common carp to different cadmium concentrations, 0 $\mu\text{g L}^{-1}$, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. This study used the V3-V4 variable regions of the 16S rRNA to compare the gut microbiome's diversity among control and treatment groups. The results showed that cadmium (Cd) exposure considerably decreased the gut microbiome diversity of common carp and revealed an increased abundance of Cd-resistant microorganisms (*Methylobacterium* and *Methylophilus*). Increasing the abundance of Cd-resistant bacteria species in response to high cadmium concentrations might explain the resistance of the common carp in highly polluted waters, but it needs to be investigated. Furthermore, a hierarchical clustering tree demonstrated that microbial communities clustered into two groups: the microbiome compositions of the control and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ group clustered, while 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ clustered separately. Despite the hierarchical clustering, the control and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ groups had relatively different operational taxonomic units. Metagenomics using 16S rRNA may not be sufficient in studying the role of each OTUs in the host immune system and heavy metal tolerance. However, this study stated that metagenomics allows researchers to identify the community of the gut microbiome associated with cadmium's toxicity.

Chronic copper exposure also negatively affected the gut microbiome composition and lipid metabolism in common carp in the treatment groups (0.07 mg/L, 0.14 mg/L, 0.28 mg/L) compare to control [23]. The decreased abundance of *Lactobacillus*, *Bacillus*, and *Akkermansia* in the

common carp's gut was observed from treatment groups (table 1). For example, the widely applied probiotic *Lactobacillus* prevents pathogen invasions and activates the nutrition intake of fishes. The abundance of *Lactobacillus* lowered to 0.82 % in the 0.07 mg/L Cu treatment group from 1.04 in control group. However, it decreased to 0.25 in the 0.28 mg/L Cu treatment group. Consequently, the risk of pathogen invasion increased in the gut of copper-exposed common carp following reduced abundance of beneficial bacteria. On the other hand, pathogen-related bacteria (*Pseudomonas* and *Acinetobacter*) were abundant from the gut samples of treatment groups (table 1). The presence of these genera in the gut of copper-exposed common carp might suggest that the gut's functional barrier was disrupted, and those fish are vulnerable to pathogen invasion.

Furthermore, Meng and others study found out that the gut microbiome communities associated with lipid metabolism and immunity were disturbed due to waterborne chronic copper exposure [24]. The expression of five genes related to lipid metabolism in common carp's liver was investigated using 18s mRNA primers and the results revealed suppressed expression of lipogenic enzymes. Lipogenic enzymes involve in energy storage through synthesis of triglycerides and fatty acids and their suppressed expression can indicate organism's reduced growth. These findings positively correlated with taxonomic composition analysis. *Allobaculum*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* and *Ruminococcus* are well-known as short chain fatty acid (SCFA) producers and the abundance of these microorganisms decreased in copper-exposed common carp's gut. Since SCFAs protect intestinal epithelial cells from pathogen invasion and the reduction of SCFA synthesis can indicate the energy disbalance and metabolic dysfunction in analysis of taxonomic composition supported this conclusion.

Kakade and others first studied the impacts of a mixture of different heavy metals [chromium (Cr), cadmium (Cd), copper (Cu)] on the gut microbiome communities of common carp collected from the Yellow River, China [7]. Gut contents were sampled for DNA extraction and PCR amplification from the control, 0.8mg/L, and 3.2 mg/L treatment groups. For PCR amplification, they used the V3 and V4 variable regions of the 16S rRNA gene. The sequencing

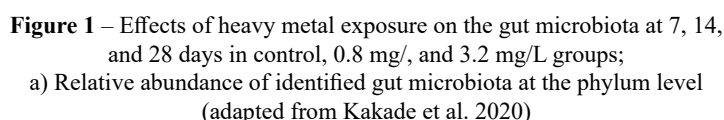
results demonstrated that high concentrations of heavy metals have led to significant changes at the phyla level in the treatment groups after 7 and 28 days of exposure. On day 14, *Firmicutes* (99.16%) were only phyla present in the 3.2 mg/L group, while on day 7, *Firmicutes* was 3.54%. On day 7, in the 3.2 mg/L group *Proteobacteria* was the most abundant (82.45%) phyla; however, this phylum disappeared from the gut content on day 14 (Figure 1). The authors think that *Firmicutes* could be highly resistant to high concentrations of heavy metals, especially Cr because its concentration was the highest among heavy metals in the mixture. It showed high accumulation compare to Cu and Cd at the end of the study. Also, the disappearance of other taxa in the 3.2 mg/L groups suggest that they might have a limited tolerance to exposure to extreme chromium concentrations. Another study found that *Bacteroides* abundance increased following cadmium exposure. [24]. However, this study indicated that supplementing probiotics such as *Bacillus coagulans* can alleviate cadmium toxicity and relieve intestinal barrier damage resulted cadmium exposure.

Chupani et al. (2019) studied the effect of food-borne ZnO nanoparticles on common carp's gastrointestinal microbiota [25]. For PCR amplification, they targeted the V4 variable region (515F-806R) of the 16S rRNA. They did not find significant differences in the gut microbiota compositions between the control (no added ZnO nanoparticles) and treatment groups (500 mg/kg feed ZnO nanoparticles). However, treatment group individuals had a relatively high abundance of *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, and *Aeromonas* compared to control group individuals. *Flavobacterium* and *Aeromonas* are associated with bacterial pathogens of fish in the wild, for instance. The presence of *Flavobacterium* and *Aeromonas* might indicate the disturbance of the balance of the gut microbiome of common carp after exposure to ZnO nanoparticles. It can lead to thriving opportunistic pathogens in the gastrointestinal tract of fish when exposed to toxic heavy metals in the wild and aquaculture. Moreover, this study showed that gastrointestinal microbial species diversity differs among individuals studied but did not significantly change in the gut microbiome diversity between the control and treatment groups.

Table 1 – Relative abundance (%) of sequences associated with lipid metabolism, probiotics and potential pathogens in the intestinal tissues of common carp following exposure to different concentrations of Cu (Meng et al. 2018)

Phyla/genera	Control	0.07 mg/L Cu	0.14 mg/L Cu	0.28 mg/L Cu
F/B	1.10 ± 0.21 ^a	0.88 ± 0.11 ^a	0.51 ± 0.03 ^b	1.34 ± 0.16 ^a
Blautia (%)	0.07 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	NF	NF
Phascolarctobacterium (%)	0.06 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
Roseburia (%)	0.14 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^b
Faecalibacterium (%)	0.12 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.03 ^b	0.02 ± 0.01 ^c	0.02 ± 0.01 ^c
Ruminococcus (%)	0.19 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.02 ^b
Coprococcus (%)	0.08 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b
Bacteroides (%)	0.29 ± 0.01 ^{ab}	0.68 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.03 ^{ab}	0.12 ± 0.04 ^b
Allobaculum (%)	0.11 ± 0.02 ^a	0.07 ± 0.02 ^{ab}	0.03 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b
Lactobacillus (%)	1.04 ± 0.29 ^a	0.82 ± 0.20 ^a	0.33 ± 0.04 ^b	0.25 ± 0.12 ^b
Bifidobacterium (%)	0.15 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.02 ^c	0.03 ± 0.01 ^c
Akkermansia (%)	0.10 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.00 ^b
Acinetobacter (%)	0.17 ± 0.02 ^b	0.33 ± 0.06 ^b	0.63 ± 0.10 ^a	0.57 ± 0.07 ^a
Pseudomonas (%)	1.20 ± 0.22 ^b	1.03 ± 0.35 ^b	0.52 ± 0.05 ^b	6.11 ± 0.52 ^a

Note: Values are mean ± SEM and values with different letters within the same row are significantly different at $P < 0.05$; NF means not found.



In the future, understanding the role of each operational taxonomic unit of the gut microbiome in the host physiology, homeostasis, metabolism, and disease resistance would be more beneficial for regulating the diet of fish in hatcheries and aquaculture. Changes in the gut microbiome composition caused by heavy metal exposure helps to estimate threshold concentrations of heavy metals in freshwaters. Future studies should also use wild fish because other environmental factors such as temperature, habitat usage, and food availability are different from laboratory conditions. The effects of heavy metals interacting with other environmental factors might affect the gut microbiome composition of fish differently. With regard to heavy metals, it is understandable to conduct experiments in a laboratory where other variables are under control to distinguish heavy metals' real impacts on the gut microbiome composition. Moreover, using different DNA extraction methods [26] and

Heavy metal exposure alters the gut microbiome composition and decreases the diversity of the gut microbiota at phylum and genera level in common carp. The influence of heavy metals varies depending on a type of heavy metal exposed. Nevertheless, heavy metals resulted in gut dysbiosis and increased pathogen invasion. Metagenomics allow researchers to identify the gut microbiome diversity and composition, however it limits to understand how microorganisms help common carp to resist highly polluted waters.

I would like to thank Prof. Peter Sorensen for his help to write this paper. I would also like to thank Dr. Loren M Miller, for provided feedback on this paper to improve the writing style.

1 Oves M., Saghir K.M., Huda Q.A., Nadeen F.M., Almeelbi T. (2016) Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. *J Bioremed Biodeg.*, vol. 7, no. 2. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000312>

2 Garbarino J.R., Hayes H.C., Roth D.A., Antweiler R.C., et al. (1995) Contaminants in the Mississippi River: Heavy metals in the Mississippi River. Reston, Virginia: U.S. GEOLOGICAL SURVEY CIRCULAR. no. 1133. Available from <https://pubs.usgs.gov/circ/1995/circ1133/heavy-metals.html> [accessed 01 October 1996]

- 3 Lovinskaya A., Kolumbayeva S., Begimbetova D., Suvorova M., Bekmagambetova N., Abilev S. (2021) Toxic and genotoxic activity of river waters of the Kazakhstan. *Acta Ecologica Sinica*, vol. 41, no. 6, pp. 499-511 <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.01.011>
- 4 Masindi V., Muedi L.K. (2018) Environmental contamination by heavy metals. Intech. Available from <https://www.intechopen.com/books/heavy-metals/environmental-contamination-by-heavy-metals> [accessed 27 June 2018]
- 5 Dai J., Zhang L., Du X., Zhang P., Li W., Guo X., Li Y. (2018) Effect of lead on antioxidant ability and immune responses of crucian. *Biological Trace Element Research*, vol. 186, pp. 546-553. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1316-z>
- 6 Ayan S., Sarsekova D., Kenesaryuly G., Yilmaz E., Gülseven O., Şahin İ. (2021) Accumulation of heavy metal pollution caused by traffic in forest trees in the park of Kerey and Janibek Khans of the city of Nur-Sultan, Kazakhstan. *J. For. Sci.*, vol. 67, pp. 357–366. <https://doi.org/10.17221/37/2021-JFS>
- 7 Kakade A., Salama E., Pengya F., Lui P., Li X. (2020) Long-term exposure of high concentration heavy metals induced toxicity, fatality, and gut microbial dysbiosis in common carp, *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution*. vol. 266, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115293>
- 8 Eichmiller J.J., Hamilton M.J., Staley Ch., Sadowsky M.J., Sorensen, P.W. (2016) Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. *Microbiome*, vol. 4, no. 44. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0190-1>
- 9 Tyagi A., Singh B., Billekallu Thammegowda N.K. (2019) Shotgun metagenomics offers novel insights into taxonomic compositions, metabolic pathways and antibiotic resistance genes in fish gut microbiome. *Arch Microbiol*, vol. 201, pp. 295–303. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1615-y>
- 10 Degregori S., Casey J.M., Barber P.H. (2021) Nutrient pollution alters the gut microbiome of a territorial reef fish. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 169, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112522>
- 11 Handelsman S. (2004) Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 4, no. 68, pp. 669-685. doi:10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004
- 12 Legrand T.P.R.A., Wynne J.W., Weyrich L.S., Oxley A.P.A. (2020) A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome. *Reviews in Aquaculture*, vol. 12. 1101-1134. DOI 10.1111/raq.12375
- 13 Nugrahi T.N.U., Mulyani Y., Agung M.U.K., Iskandar. (2021) Community structure of Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) gut bacteria in the Cirata Reservoir, West Java Province, Indonesia. *World Scientific News*, vol. 161, pp. 130-142.
- 14 Tarnecki A.M., Burgos F.A., Ray C.L., Arias C.R. (2017) Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *J Appl Microbiol.*, vol. 123, no. 1, pp. 2-17. <https://doi.org/10.1111/jam.13415>
- 15 van de Peer Y., Chapelle S., de Wachter, R. (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, vol. 17, no. 24, pp. 3381-3391. <https://doi.org/10.1093/nar/24.17.3381>
- 16 Wu S., Wang G., Angert E.R., Wang W., Li W., Zou H. (2012) Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, e30440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030440>
- 17 Martin A.A. (2002) Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, vol. 8, no. 68, pp. 3673-3682. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3673–3682.2002
- 18 Kroes I., Lepp P.W., Relman D.A. (1999) Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *PNAS.*, vol. 25, pp. 14547-14552. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14547>
- 19 McCaig A.A., Glover L.A., Prosser J.I. (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and pastures diversity in unimproved and improved upland grass. *Applied and environmental microbiology*. vol. 4, no. 65, pp. 1722-1730.
- 20 Ye L., Amberg J., Chapman D., Gaikowski M., Liu W. (2014) Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. *ISME J.*, vol. 8, no. 3, pp. 541-551. 10.1038/ismej.2013.181 (doi.org)
- 21 Malekpouri P., Peyghan R., Mahboobi-Soofiani N., Mohammadian, B. (2016) Metabolic capacities of common carp (*Cyprinus carpio*) following combined exposure to copper and environmental hypoxia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. vol. 127, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.004>
- 22 Chang X., Li H., Feng J., Chen Y., et al. (2019) Effects of cadmium exposure on the composition and diversity of the intestinal microbial community common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 171, pp. 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.066>
- 23 Meng X., Li Sh., Qin C., Zhu Zh., et al. (2018) Intestinal microbiota and lipid metabolism responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) following copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 160, pp. 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.050>
- 24 Chang X., Kang M., Shen Y., Yun L., et al. (2021) *Bacillus coagulans* SCC-19 maintains intestinal health in cadmium-exposed common carp (*Cyprinus carpio* L.) by strengthening the gut barriers, relieving oxidative stress and modulating the intestinal microflora. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 228. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112977>
- 25 Chupani L., Barta J., Zuskova, E. (2019) Effects of food-borne ZnO nanoparticles on intestinal microbiota of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Science and Pollution Research*. vol. 6, pp. 25869-25873. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05616-x>
- 26 Han Zh., Sun J., Lv A., Wang, A. (2019) Biases from different DNA extraction methods in intestine microbiome research based on 16S rDNA sequencing: a case in the koi carp, *Cyprinus carpio* var. Koi. *MicrobiologyOpen*, vol. 626, pp. 1-9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.626>

1-бөлім
БОТАНИКА

Section 1
BOTANY

Раздел 1
БОТАНИКА

A.T. Aitbayeva^{1*}, T.Ye. Aitbayev^{1,2}, Zh.Zh. Mamyrbekov^{1,2},
B.D. Zorzhanov^{1,2}, M.Zh. Koshmagambetova¹

¹Regional filial LLP «Kazakh Research Institute of Fruit and Vegetable Growing» «Kainar»,
Kazakhstan, Almaty region, Kainar village

²Kazakh National Agrarian University, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: aitbaeva_a_86@mail.ru

THE INFLUENCE OF ORGANIC AND BIOLOGICAL FERTILIZERS ON GROWTH PROCESSES, PRODUCTIVITY AND QUALITY OF MELON FRUITS IN THE SOUTH-EAST OF KAZAKHSTAN

Melon cultivation is an important feature of agriculture in Kazakhstan. According to Kazakh Academy of Nutrition, the rate of melon field consumption per 1 inhabitant per year is 26 kg.

In 2019, the cucurbits in the country were cultivated on an area of 102.1 thousand hectares, the gross harvest amounted to 2382.1 thousand tons, i.e. 132.3 kg per inhabitant per year. These data show the high export potential of the melon industry in Kazakhstan.

As we know, 95-97% of melons are consumed fresh. In this aspect, there is a need to produce natural, high-quality melons of particular relevance. The organic melon products can be grown in the climate of maximum biologization of agricultural technologies.

In Kazakhstan, the production of organic melon products is at the beginning of development. The most open and regulated elements of biological melon cultivation in the production environment include the use of organic fertilizers and biological products instead of chemical ones. The data received in the process of scientific research showed that the use of organic and biological fertilizers helped to raise fresh plants and process acceleration of fruit ripening by an average of 3-5 days. The productivity of melon grew to 37.32% with biologized fertilizer systems. So, the quality of melon fruits has increased for the non-fertilized control. Providing the low cost and high payback of organic fertilizers, the positive influence on the productivity and ecological purity of the cultivated products, we can do a conclusion about the potential transition of the melon industry of the country from traditional ways of cultivation to alternative ones.

Key words: melon, phenology, biometrics, organic and biological fertilizers, variety research, biochemical composition, productivity, quality.

A.T. Айтбаева¹, Ж.Ж. Мамырбеков^{1,2}, Т.Е. Айтбаев^{1,2},
Б.Д. Зоржанов^{1,2}, М.Ж. Кошмағамбетова¹

¹«Қазақ жеміс және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
Қазақстан, Алматы облысы, Қарасай ауданы, Қайнар п.

²Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: *aitbaeva_a_86@mail.ru

Қазақстанның оңтүстік-шығысы жағдайында органикалық және биологиялық тыңайтқыштардың қауын дақылының өсу үрдістеріне, өнімділігі мен сапасына әсері

Бақша шаруашылығы – Қазақстан ауыл шаруашылығының маңызды саласы. Қазақ тағам академиясы мәліметтері бойынша 1 тұрғынға келетін бақша тұтыну мөлшері жылына – 26 кг.

2019 жылы елімізде бақша дақылдары 102,1 мың гектар жерде өндіріліп, жалпы жиын-терін көлемі 2382,1 мың т, яғни әр жергілікті тұрғынға шаққанда 132,2 кг құрады. Бұл мәліметтер Қазақстандағы бақша саласының жоғары экспорттық потенциалын растайды.

Бақша өнімдерінің 95-97% балғын күйде тұтынылатыны белгілі. Осы орайда, табиғи, жоғары сапалы бақша өнімдерін өндіру өзекті болып табылады. Экологиялық таза бақша өнімдерін агротехнологиялық шараларды барынша биологизациялау арқылы өндіруге болады.

Қазақстанда экологиялық таза бақша өндірісі дамудың бастапқы сатысында тұр. Өндіріс жағдайында химиялық бақша шаруашылығын биологиялық бағытқа бұрудың ең қолжетімді және реттелмелі тәсілдеріне органикалық тыңайтқыштар мен биологиялық препараттарды қолдану жатады.

Ғылыми-зерттеулер барысында алынған мәліметтер органикалық және биологиялық тыңайтқыштарды қолдану, өсімдіктердің жасыл массасының ұлғаюына және жемістердің орташа есеппен 3-5 тәулікке ерте пісіп-жетілуіне ықпал етті. Биологиялық тыңайту жүйесінде қауын өнімділігі 37,32%-ға артты. Тыңайтылмаған бақылау нұсқасымен салыстырғанда қауын жемістерінің барлық сапалық көрсеткіштері жақсарды.

Жоғарыда айтылғандарды тұжырымдай отырып, органикалық тыңайтқыштардың төмен өзіндік құны мен жоғары өтімділігін және өндірілетін өнім өнімділігі мен экологиялық тазалығына оң әсерін ескерсек, еліміздің дәстүрлі бақша шаруашылығын альтернативті өндіріс бағытына бұру мүмкіндігі туралы қорытынды жасауға болады.

Түйін сөздер: қауын, фенология, биометрия, органикалық және биологиялық тыңайтқыштар, биохимиялық құрам, өнімділік, сапа.

А.Т. Айтбаева^{1*}, Ж.Ж. Мамырбеков^{1,2}, Т.Е. Айтбаев^{1,2},
Б.Д. Зоржанов^{1,2}, М.Ж. Кошмагамбетова¹

¹Региональный филиал ТОО «Казахский научно-исследовательский институт плодовоовощеводства» «Кайнар», Казахстан, Алматинская область, Карасайский р-он, п. Кайнар

²Казахский Национальный аграрный исследовательский университет, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: aitbaeva_a_86@mail.ru

Влияние органических и биологических удобрений на ростовые процессы, продуктивность и качество плодов дыни на юго-востоке Казахстана

Бахчеводство – важная отрасль сельского хозяйства Казахстана. По данным Казахской академии питания, норма потребления бахчи на 1 жителя в год составляет 26 кг.

В 2019 году бахчевые культуры в стране возделывались на площади 102,1 тыс. га, валовые сборы составили 2382,1 тыс. т., т.е. 132,3 кг на каждого жителя в год. Эти данные свидетельствуют о высоком экспортном потенциале бахчевой отрасли Казахстана.

Известно, что 95-97% бахчи употребляется в пищу в свежем виде. В этом аспекте необходимость производства натуральной, высококачественной бахчи приобретает особую актуальность. Экологически чистую бахчевую продукцию можно вырастить в условиях максимальной биологизации агротехнологий.

В Казахстане производство экологически чистой бахчевой продукции стоит на начальном этапе развития. К наиболее доступным и регулируемым в условиях производства элементам биологического бахчеводства относится использование органических удобрений и биопрепаратов взамен химическим.

Полученные в ходе научных исследований данные показали, что внесение органических и биологических удобрений способствовало увеличению зеленой массы растений и ускорению процессов созревания плодов в среднем на 3-5 суток. На биологизированных системах удобрений продуктивность дыни возросла на 37,32%. Улучшились все качественные показатели плодов дыни к неудобренному контролю. Исходя из вышеизложенного, учитывая невысокую стоимость и большую окупаемость органических удобрений, положительное влияние на продуктивность и экологическую чистоту возделываемой продукции, можно сделать вывод о возможности перехода бахчевой отрасли страны от традиционных способов возделывания на альтернативные.

Ключевые слова: дыня, фенология, биометрия, органические и биологические удобрения, биохимический состав, продуктивность, качество.

Abbreviations

N – nitrogen, P – phosphorus, K – potassium, t – ton, ha – hectare, t/ha – ton per hectare, kg – kilogram, g – gram, mg – milligram, m² – square meter, mg% – milligram/percent, % – percent, MPC – maximum permissible concentration.

Introduction

Biological or alternative agriculture is given particular emphasis and huge financial

resources are allocated around the world. All the world's major economies are developing organic farming more focused and balanced than ever before. And the reason for this one is the comprehensive factors, such as the health of the nation and the agricultural state of the environment [1-3].

The rapid growth of the world's population and, as a result, the urbanization of small towns into megalopolises leads to a global demand of food products followed by the forced expansion of agricultural land [4].

There has been a sharp rise in the use of mineral fertilizers and chemical plant protection products over the past 50-60 years due to the increase in planting acreage, as well as to increase the yield of agricultural crops [5]. There is also an active anthropogenic influence on the soil cover by raising the number of mechanical processing operations.

The annual growth of crops drives up the volume and frequency of agrochemicals application. Every year, 10 to 15 types of chemical protection products are synthesized in the world. Hundreds of thousands of different types of pesticides are used on crops in volumes of more than 2-2.5 million tons per year [6].

The negative effects of agricultural chemicalization are making scientists and consumers of agricultural products more and more wary. There are calls for a partial and even total rejection of chemical agents. However, except for the nutritional value of the cultivated products, in recent decades, the more frequent use of synthetic fertilizers, pesticides, hormones, etc. in traditional production in some cases leads to a lower quality and safety of products and a violation of natural relations in ecosystems [7].

In 2017, UN experts reported 200,000 fatal pesticide poisonings per year, and that fixed contact with pesticides is related to cancer, Alzheimer and Parkinson's diseases, endocrine diseases, developmental disabilities, and sterility [8-9].

A series of events in 2020 related to the coronavirus pandemic shows that the main well-being of all countries lies in the health of the people.

The organic farming system is widely considered to be a more sustainable and safe agricultural system, as it aims to produce healthy food while preserving the soil. The stability of such agrocenoses is guaranteed by minimizing the negative influence on the agricultural ecosystem (avoiding the use of pesticides and other plant protection products, chemical fertilizers, GMOs, ionizing radiation) and introducing an environmentally sound farming system with obligatory monitoring of the state of the entire agrobiocenosis in the system of ecological-meliorative and agroecological monitoring [10-12].

The organic farming is conducted in almost all countries of the world. The share of farms that supply natural agricultural products is under constant growth in the total land area and in the structure of agricultural enterprises. The market for these products is also rapidly expanding, not only in Europe, North America and Japan, where the largest markets are located, but also in developing countries [13].

According to the Research Institute of Organic Agriculture (FiBL) and the International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM), the area with organic farming has increased 6-fold over the past 20 years, reaching 1% of the world's agricultural land area or 71.5 million hectares of cultivated land [14-16].

Australia has the largest area of organic agriculture in the world – 35.7 million hectares. In Europe, organic products are cultivated on an area of 15.6 million hectares. It is followed by Latin America (8 million ha), Argentina (3.6 million ha) and China (3.1 million ha). Switzerland, Denmark and Sweden are the world leaders in terms of organic food consumption per person [17-18].

And Kazakhstan is no exception among the countries that practice organic agriculture. However, the production and market of organic products are still at an early stage of development, despite the adopted law of the country “On the production of organic products”, introducing the “Rules for the production and turnover of organic products”, the approval of the list of permitted products, as well as the certification of organic products under ST RK 1618-2007, adopted in the country in 2015. All organic products are imported to Kazakhstan mostly from Europe, which leads to high prices for them.

There is also a drop in the area occupied for organic farming by almost 2 times in comparison with 2016 (303.4 thousand hectares). Today, the land with organic production in Kazakhstan is about 192 thousand hectares [19].

Melon cultivation is one of the main agricultural sectors in Kazakhstan that is largely come into play to organic farming. It should be noted there is no organic melon cultivation in the country at all even if the traditional production is quite high.

The edaphoclimatic conditions of Kazakhstan make it possible to produce high volumes of vegetable and melon crops, thus providing the national market with a full range of agricultural products [20-21]. Our country has a great export potential for cucurbits. According to the statistics of 2019, in Kazakhstan, the cucurbits were cultivated on an area of 102.1 thousand hectares, the gross harvest was 2382.1 thousand tons. Based on the above data, Kazakhstan may well turn into a producer and supplier of organic melon products in the global society.

The transition of the melon industry in Kazakhstan to purely organic production becomes complicated by the lack of scientific research in this direction, which provides for a complete rejection to use agrochemicals and GMOs. In this

aspect, research on the biologization of the main agrotechnological elements of melon cultivation, as well as the study and selection of tolerant varieties of melon to harmful objects are most important.

So, taking the above mentioned into consideration, under the grant project of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan for young scientists “Production technology of organic melon products (watermelon, melon) in the south-east of Kazakhstan” for 2020-2022, URN project AP 08052493, we conducted field and laboratory research to study the influence of various types of organic and biological fertilizers on biometric indicators, quality and productivity of melon fruits, as well as the selection and study of new adaptive and green varieties of melon and melon with the best economically valuable characteristics for organic melon cultivation.

Materials and Methods

The experiments were conducted at the Experimental Clinic of the Laboratory “Selection of vegetable and melon crops” and in the laboratory “Bio-safety and Biocontrol of vegetable and melon crops” of Regional Branch “Kainar” of the LLP “Kazakh Research Institute of Fruit and Vegetable Growing” which is located in the foothill zone of the south-east of Kazakhstan (43°09'32.8"N 76°26'57.3"E) North Slope of Zailiyskiy Alatau Mountains (Altitude : 1000-1050 m) during the growing season 2020 with a view to finding out the melon expo as well as determining the different organic fertilizers such as biohumus, manure, poultry manure, grain straw, biohumus and recommended chemical NPK fertilizers. The locations of the evaluations were characterized by the continental climate (large daily and annual fluctuations in air temperature, characterized by cold winters and long hot summers), the air temperature reaches minimum values in January (-32 -35°C), and maximum values in July (37-43°C). The warm period lasts 240-275 days, the frost-free period is 140-170 days and an annual amount of precipitation is 350-600 mm.

The soil belongs to the general soil type of dark chestnut. The land was medium high with loamy. Before conducting the experiment, the soil sample was analyzed from Kazakh Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry named after U.Uspanov. The soil was characteristically slightly alkaline (pH 7.3-7.4), soil organic matter 2.9-3.0% (moderate), total N 0.18-0.20% (high), available P_2O_5 35-40 mg kg⁻¹ (moderate), available K_2O 360-390 mg kg⁻¹ (low), cation exchange capac-

ity 20-21 me 100g⁻¹ soil, bulk density 1.1-1.2 gr cm³, field capacity 26.6%.

The sources of chemical fertilizers utilized were: ammonium nitrate 34.5% N, double super-phosphate 46% P_2O_5 and potassium chloride 60% K_2O . The source of the organic fertilizer utilized was biohumus, manure, poultry manure, grain straw, biohumus, whose contents of organic matter, nitrogen, phosphorus and potassium are presented in Table 1.

Table 1 – Composition of organic wastes, measured variables

Organic materials	Organic matter, %	C:N	N, %	P_2O_5 , %	K_2O , %
Manure	21		0,5	0,25	0,6
Poultry manure	40-56		1,6	1,5	0,8
Grain Straw	35-40		0,5	0,25	0,8
Biohumus	40-60		2,2	1,8	1,6

Treatments and Experimental Design

The experiment was performed using a completely randomized block design with four replications. The soil was ploughed, harrowed, and flat seedbeds measuring 28 m² (2,8 m x10 m). were made. Each plot was separated from the other by a one-metre alley. Fertilizer was applied using grain drill. The design of the experiment was a randomized complete block replicated thrice. Treatments comprised control, biohumus, manure, poultry manure, grain straw, biohumus and recommended chemical NPK fertilizers. The experimental field was prepared in accordance with a standard practice used by RB Kainar of LLP Kazakh Research Institute of Fruit and Vegetable Growing. Other agronomic practices and data collection were conducted based on the recommendations ($N_{120}P_{120}K_{150}$) of Kazakh Research Institute of Fruit and Vegetable Growing. The experiment was performed with the following 8 treatments.

- T1: Control (non-fertilization)
- T2: Control No. 2 (fertilized - $N_{120}P_{120}K_{150}$)
- T3: Biohumus (10 t ha⁻¹)
- T4: Biohumus (15 t ha⁻¹)
- T5: Manure (40 t ha⁻¹)
- T6: Poultry manure (5 t ha⁻¹)
- T7: Poultry manure (10 t ha⁻¹)
- T8: Grain Straw (3 t ha⁻¹) + Recommended fertilizer dose ($N_{90}P_{60}K_{60}$)

The trial was implemented on April-May and the harvest began in the first decade of August and Trial was well protected against insects and weeds during the season.

Melon expo was planted on 22 May 2020. The size of each elemental plot was 28 m² and included seven planting rows 1.5 m apart with eight plants per row, with a distance of 1.5 m between plants. The irrigation system, which was similar to that used by farmers in the area, consisted of one drip line per crop row and emitters of 2 l/h – 1, 0.5 m apart.

Melons were harvested by hand when the fruit matured. Melons were picked by experienced persons and in general fruit were considered mature when the tendril nearest to fruit start to dry, and color of fruit on the bottom side changed from creamy white to yellowish. Fruits were measured and weighed during harvest and total yield and phenological observations were determined. In addition, the total sugar content was determined using the Bertrand method vitamin C determined according to Murri, nitrate content was determined potentiometrically with ion-selective electrodes.

The following classical methodologies were used in the research: Methodology of Field Experience (B.I.Dospekhov, 1985) [22]; Methodology of Experimental Work in Vegetable Growing and Melon Cultivation (V.F.Belik, 1992) [23]; Methodology of Watermelon and Melon Breeding (Moscow, 1998) [24].

Results and Discussion

The further yield of cucurbits is defined by the degree of vegetative biomass development of plants. A decrease in the assimilation surface of melon leaves at the intensive development and formation of vegetative organs can have a negative effect on the productivity level. The low volume of the leaf area leads to a decrease in photosynthesis, in the process of which the plants are suppressed and the size of the fruit is reduced. The leaves of cucurbits are the main conductor of nutrients to the fruits [25-27]. Therefore, the longer and greener the leaves, the larger and tastier the fruits.

So, taking the above mentioned into consideration, we have studied the influence of organic and biological methods of fertilization on the beginning of the main phenological phases of development and biometric parameters of melon plants. As a comparison, 2 control options were set: control No. 1 – without fertilizing; control No. 2 – with fertilizing (N₁₂₀P₁₂₀K₁₅₀).

The results of phenological observations at the experimental plots showed that according to

the possible experiments, where different types of organic and biological fertilizers were applied to the melon, the main phases of plant development occurred a few days earlier than in control No. 1, where fertilizers were not used at all.

The process acceleration of plant growth and development is explained by the positive influence of biological fertilizers on the dynamics of the root system development and the underground mass of plants as a whole. The periods of the beginning and finishing of a certain phenological phase on melon passed faster in the variants where manure was introduced under the culture – at the rate of 40 t/ha, biohumus – 15 t/ha and poultry manure – 10 t/ha. There was also an improvement in growth processes in the second control variant, where the plants were fertilized with the full rate of mineral fertilizers (N₁₂₀P₁₂₀K₁₅₀). As to nonfertilized control, all the processes of watermelon plant development were delayed and occurred on average 3-5 days later than the samples (Figure 1 – Phenological observations in experiments with melon culture, 2020).

To identify the intensity of growth and development of melon plants, the formation of its biomass and food organs, biometric studies were conducted at all experimental plots in the phases: wattle formation – the beginning of flowering and mass flowering – the formation of fruits. According to the results of the research, it was found that the biometric indicators of plants in the variants with different combinations of organic and biological fertilizers exceeded the first (non-fertilized) control in all parameters. During the period of wattle formation, the most intensive growth in the development of the green mass of melon was recorded in the variants where manure was applied at the rate of 40 t/ha, biohumus – 15 t/ha and poultry manure – 10 t/ha (Table 2).

In order to more objectively assess the influence of the studied fertilizer systems, the second biometric measurements were made in the phases of development-mass flowering – fruit formation. When using biofertilizers, melon plants showed the lengthening and thickening of the main stem on the melon culture – from 84,10 cm in control No. 1 to 89,15-110,51 cm and from 2,44 cm to 2,70-2,96 cm, an increase in the quantity of side shoots – from 5,65 pcs. to 6,05 pcs., the length of internodes – from 6.30 to 6.53-8.60 cm and Leafstick length – from 5.81 cm to 6.05-10,42 cm, leaf apparatus – from 7.66 to 8.54-10.42 cm in width and from 6.88 to 7.30-8.68 in length. There was an increase in the quantity of ovaries – from 13.35 pcs. to 16.7 pcs.

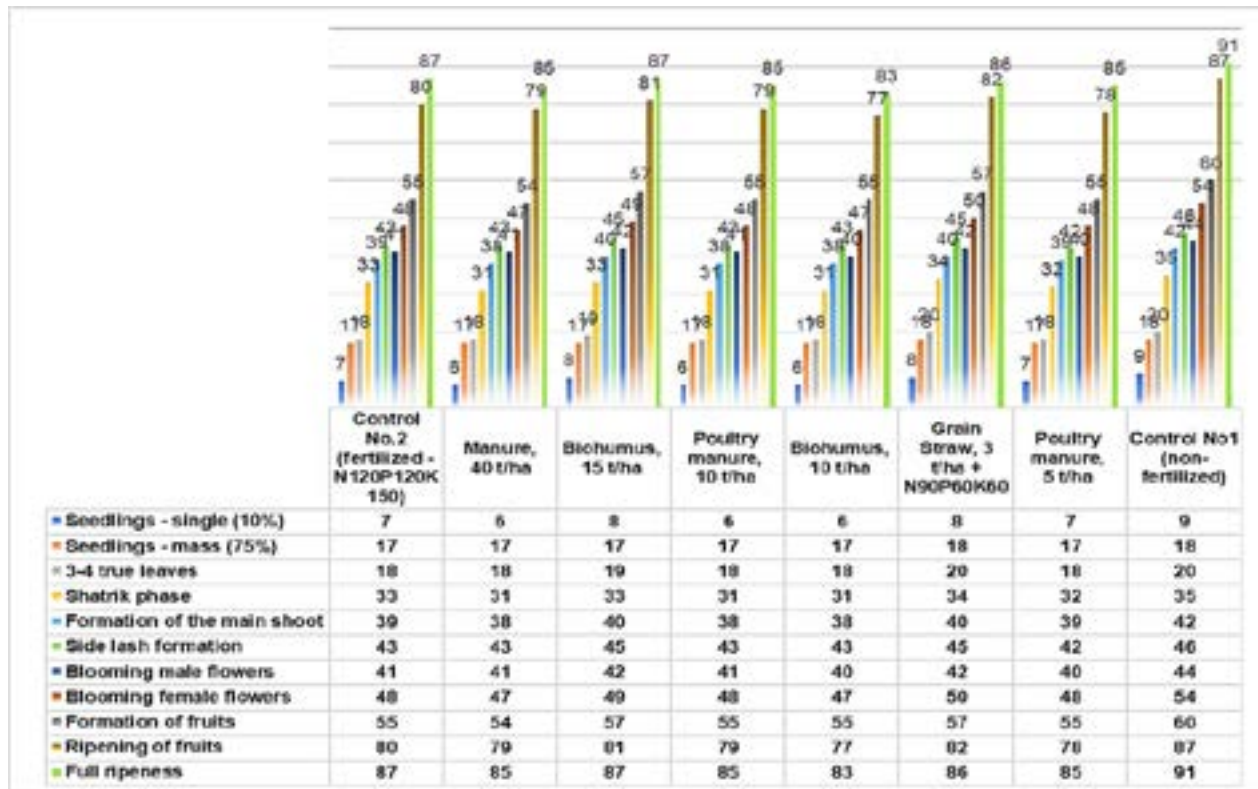


Figure 1 – Phenological observations in experiments with melon culture, 2020.

Table 2 – The influence of various types and combinations of organic and biological fertilizers on the formation of melon plant biomass (wattle formation – the beginning of flowering), 2020.

Experience options	Length of the main shoot, cm	Quantity of stems, pcs.	Base thickness, cm	Internode length, cm	Male flowers, pcs	Female flowers, pcs	Ovaries, pcs	Middle mass of plants, g
Control No. 1 (non-fertilized)	56,30	5,65	1,40	5,40	5,35	0,82	0,42	193,3
Control No. 2 (fertilized -N ₁₂₀ P ₁₂₀ K ₁₅₀)	69,80	6,92	1,76	6,31	7,77	1,35	0,95	235,4
Biohumus, 10 t/ha	61,92	5,82	1,49	5,82	6,67	1,0	0,7	224,2
Biohumus, 15 t/ha	66,32	5,95	1,59	5,94	6,97	1,25	0,80	229,4
Manure, 40 t/ha	70,65	6,25	1,69	6,28	6,95	1,22	0,85	238,6
Poultry manure, 5 t/ha	60,50	5,67	1,48	5,43	6,47	0,9	0,62	230,8
Poultry manure, 10 t/ha	66,30	5,90	1,59	5,91	6,85	1,05	0,75	238,5
Grain Straw, 3 t/ha + N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀	60,37	5,42	1,40	5,74	5,97	0,85	0,50	210,5

The average weight of melon was equal to 286,5 g on the non-fertilized control variant, and 530,6 g on the variant fertilized with full mineral fertilizer, and 382,5-510,25 g on the variants with organic fertilizers and biohumus. The large-

est fruit mass was formed in the variants where “Manure, 40 t/ha – 510,25 g”, “Grain Straw, 3 t/ha + N₉₀P₆₀K₆₀” – 458,90 g and “Biohumus, 15 t/ha” – 413,95 g were added for cucurbits (Table 3).

Table 3 – The influence of various types and combinations of organic and biological fertilizers on the formation of melon plant biomass (mass flowering – fruit formation), 2020.

Experience options	Length of the main shoot, cm	Quantity of side shoots of stems, pcs.	Base thickness, cm	Internode length, cm	Leafstick length, cm	Leaf width, cm	Leaf length, cm	Quantity of inflorescences, pcs.	Quantity of fruits, pcs.	Fruit diameter, cm	Average weight of the 1 st fruit, g
Control No. 1 (non-fertilized)	84,10	5,65	2,44	6,30	5,81	7,66	6,88	13,35	1,4	8,37	286,50
Control No. 2 (fertilized -N ₁₂₀ -P ₁₂₀ -K ₁₅₀)	110,78	6,25	3,14	8,81	7,75	10,28	8,79	20,00	2,25	10,66	530,60
Biohumus, 10 t/ha	89,15	5,80	2,71	6,53	6,05	8,54	7,30	13,65	1,55	9,20	382,50
Biohumus, 15 t/ha	95,90	5,90	2,88	6,67	6,36	9,03	7,59	14,05	1,7	9,41	413,95
Manure, 40 t/ha	110,51	6,05	2,96	8,60	7,66	10,42	8,68	16,70	2,0	10,36	510,25
Poultry manure, 5 t/ha	91,35	5,65	2,74	6,65	6,11	8,78	7,33	12,88	1,55	9,14	384,95
Poultry manure, 10 t/ha	93,35	5,65	2,77	6,73	6,22	8,87	7,32	13,10	1,65	9,27	392,15
Grain Straw, 3 t/ha + N ₉₀ -P ₆₀ -K ₆₀	100,40	5,75	2,70	7,97	7,12	9,93	8,06	13,75	1,9	9,63	458,90

The biochemical composition of fruits is closely related to the plant nutrition conditions.

The optimal nutrition greatly improves the quality of the grown products, and excessive fertilizer rates, on the contrary, degrade the quality of the grown products.

To assess the influence of various types and combinations of organic and biological fertilizers on the quality indicators of melon, we conducted biochemical analyses of the fruits in the laboratory.

The results of analytical research showed that the content of dry substances in melon fruits varied in the range of 9.74-14.96%. At the same time,

higher rates were registered in the variants where poultry manure, 5 t/ha (14.96%), poultry manure, 10 t/ha (13.02%) and manure, 40 t/ha (10.17%) were applied for crops.

The use of biological fertilizers contributed to an increase in total sugar and ascorbic acid in the fruit. In the variants where biohumus, manure and poultry manure were added to the melon, the fruits were the sweetest – 16.82-17.28%. The highest content of vitamin C was recorded in experiments with mineral fertilizers (Control No. 2) – 21.1 mg %, manure (40 t/ha) – 25.0% mg and poultry manure (10 t/ha) – 25.0 mg % (Table 4).

Table 4 – The influence of various types and combinations of organic and biological fertilizers on the quality indicators of melon fruits, 2020.

Experience options	Dry substance, %	Total sugar, %	Vitamin C, mg%	Nitrates, mg/kg (MPC-90)
Control No. 1 (non-fertilized)	11,18	15,23	18,4	24,2
Control No. 2 (fertilized -N ₁₂₀ -P ₁₂₀ -K ₁₅₀)	15,08	20,66	21,1	130,4
Biohumus, 10 t/ha	7,39	16,82	18,4	54,8
Biohumus, 15 t/ha	9,78	17,28	17,1	74,2
Manure, 40 t/ha	10,17	17,44	25,0	87,2
Poultry manure, 5 t/ha	14,96	17,04	18,4	60,8
Poultry manure, 10 t/ha	13,02	17,22	25,0	85,6
Grain Straw, 3 t/ha + N ₉₀ -P ₆₀ -K ₆₀	9,74	16,12	18,4	99,4

The research results showed that the content of nitrates in melon products was much lower than the maximum permissible concentration (MPC for melon – 90 mg/kg of raw mass) on variants where organic and biological fertilizers were applied to the crop – 54.8–87.2 mg/kg. In experiments where mineral fertilizers were used, the excess of nitrates is more than 1.5 times the maximum permissible concentration.

According to the conclusion of the Test Center of Phytosanitary Laboratory Analysis of the Kazakh Research Institute of Plant Protection and Quarantine named after Zh.Zhiembayev LLP, the Protocol of toxicological tests of soil samples showed that the content of the residual amount of pesticides was not detected in the soils of the experimental plots (Protocol No. 112-05 dated September 03, 2020).

The agricultural yield is the main efficiency indicator of agricultural technologies. Allowing for

this, we defined the productivity of melons, along with other important indicators, in our research during the development of biological fertilizer systems, depending on the conditions of its nutrition in the south-east of Kazakhstan.

According to the research, the lowest yield of melon fruits was recorded at the non-fertilized control (Control No. 1) – 17.31 t/ha. As to the mineral background, where a full mineral fertilizer was applied to the melon in the norm $N_{120}P_{120}K_{150}$, 23.96 t/ha of fruit was produced. All experience options with biological fertilizer systems exceeded the standard fruit yield of the non-fertilized control. The highest increase in yield – 23.77 t/ha was registered in the variant where manure was applied to cucurbits at a rate of 40 t/ha. As to all other variants, the increase to the control varied from 5.45 to 6.65 t/ha (Table 5).

Table 5 – The influence of various types and combinations of organic and biological fertilizer systems on melon yield, 2020.

Experience options	Fruit harvesting, t/ha			Yield, t/ha	Increase in fruit yield	
	1st	2nd	3rd		t/ha	%
Control No. 1 (non-fertilized)	5,25	5,89	6,17	17,31	-	-
Control No. 2 (fertilized - $N_{120}P_{120}K_{150}$)	6,61	8,42	8,93	23,96	6,65	38,42
Biohumus, 10 t/ha	6,67	8,22	8,14	23,03	5,72	33,04
Biohumus, 15 t/ha	6,24	8,56	8,49	23,29	5,98	34,55
Manure, 40 t/ha	6,70	8,73	8,34	23,77	6,46	37,32
Poultry manure, 5 t/ha	6,13	9,0	7,73	22,86	5,55	32,06
Poultry manure, 10 t/ha	6,04	8,71	8,22	22,97	5,66	32,70
Grain Straw, 3 t/ha + $N_{90}P_{60}K_{60}$	6,50	7,37	8,89	22,76	5,45	31,48
P, % 3,95 HCP ₀₉₅ , t/га 0,92						

Conclusion

Following the results of our research, we can conclude:

- The application of organic and biological fertilizers improves the phenological and biometric indicators of melon during the intensive growth and development of crops. It was found that all the growth parameters of melon plants occurred on average 3–5 days earlier in comparison with the non-fertilized control (No. 1) and were slightly lower than the fertilized control (No. 2). The most influential biomass of melon plants in the system of bio-organic fertilizers was formed on the variants with manure (40 t/ha), biohumus (15 t/ha) and poultry manure (10 t/ha).

- The biochemical analysis showed a positive influence of various combinations of organic and biological fertilizers on the quality indicators of melon fruits. An increase in the content of dry substances, total sugar and ascorbic acid in the products for non-fertilized control was defined.

- The soil analysis for the content of the residual amount of pesticides showed the lack of toxicological residues (Protocol No. 112-05 dated September 03, 2020) in the experimental plots. Laboratory studies melon fruits showed that NO_3 content did not exceed the maximum permissible concentration in all variants with bio-organic fertilizers.

- It was found that the application of bio-organic fertilizers substantially increased the productivity of cucurbits. The highest yields of melon are formed

on variants with manure (40 t/ha) and biohumus (15 t/ha). Thus, the increase to the yield was 31,48-37,32% to the non-fertilized control (No. 1).

Conflict of interest

All authors have read and are familiar with the content of the article and have no conflict of interest.

Acknowledgements

The research was conducted within the Grant Project of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan for young scientists. Apart from the authors of this scientific article,

the research was conducted by L. A. Buribayeva, E. U. Taishibayeva, N. N. Toylybayeva, M. Zh. Koshmagambetova, and R. K. Balgabayeva. We make a great acknowledgment and express profound gratitude to our colleagues for their active participation and important contribution in conducting field experiments and laboratory research, and receiving experimental data.

Source of financing

Program of Kazakhstan for 2020-2022 years. Funding provided by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan. Contract No. 119 dated June 01, 2020.

References

- 1 Chychkalo-Kondrats'ka I.B., Novyts'ka I.V. World experience of development of organic production. *Agrosvit*. No. 17-18. (2020): 23-27. DOI: 10.32702/2306-6792.2020.17-18.23.
- 2 Viniukova O.B., Chuhrij H.A. Organic products market in Ukraine: problems and prospects of its development. *Prychornomors'ki ekonomichni studii*. T. 26/1. (2018): 42-47. doi.org/10.21511/im.14(2).2018.02.
- 3 Tiutiunyk H. Basis of the development of organic farming national market in Ukraine. *Halyts'kyj ekonomichnyj visnyk*. T.3. № 46. (2014): 46-52.
- 4 Tilman D., Socolow R., Foley J.A., Hill J., Larson E., Lynd L., Pacala S., Reilly J., Searchinger T., Somerville C. & Williams R. Beneficial biofuels-the food, energy, and environment trilemma. *Science*. No. 325. (2009): 270-271. doi.org/10.1126/science.1177970.
- 5 Dovban K.I. Development of scientific foundations and technologies of ecological agriculture based on the use of green fertilizers and environmentally friendly use of soil resources. *Natural resources and the environment: collection of scientific materials*. Minsk: Belarusian Science. (2016): 126-129.
- 6 Omarova Z.M. The effect of pesticides on human health. *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. No. 1. (2010): 59-60.
- 7 Zdravkovska M., Agic R., Popsimonova G., Bogevska Z., & Davitkovska M. Morphological characteristics and yield of carrot (*Daucus Carota* L.) Grown with application of microbiological fertilizers. *J. of Agricultural, Food and Environmental Sciences, JAFES*. T.68. (2016): 63-67. Online ISSN 2545-4315.
- 8 Philip J. Landrigan, Charles Benbrook. GMO-s, Herbicides, and Public Health. *The new England journal of Medicine*. No. 373. (2015): 693-695. DOI: 10.1056/NEJMp1505660.
- 9 Charles M. Benbrook. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*. T. 28. No. 1. (2016): 2-8. ISSN 2190-4715. – doi:10.1186/s12302-016-0070-0.
- 10 Kussainov T.A. Estimating yield trends in agriculture: accounting for the changes in technologies and weather conditions. *Science Review*. № 1(11). (2013): 15-17.
- 11 Otutumi A.T., Oliveira T.S., Mendonça E.S. and Lima P.J. Qualidade do Solo em Sistemas de Cultivo Agroecológicos no Município de Tauá – CE. In: Oliveira T. S. (coord.) *Solo e Água: aspectos de uso e manejo com ênfase no semi-árido nordestino*. Fortaleza, Departamento de Ciências do Solo, UFC. (2004): 1-30.
- 12 Gabriel D., Sait S. M., Kunin W.E. and Benton T.G. Food production vs. biodiversity: comparing organic and conventional agriculture. *J. Apple Ecol*. No. 50. (2013): 355-364. doi.org/10.1111/1365-2664.12035.
- 13 Babadzhanyan D.D., Shokirov R.S., Abdulloeva M.G., Khasanov M.M. Trends in the development of the organic sector of agriculture in the world economy. *Bulletin of the Tajik State University of Law, Business and Politics. Humanities Series*. No. 3. (2009): 67-73.
- 14 Kaminska A. World experience of development of organic production. *Agrosvit*. No. 17-18. (2020): 23.
- 15 Wilier H., Lernoud J. The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and IFOAM – Organics International, Bonn. (2016): 38-40.
- 16 Matthew H., Anne M. The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends. FiBL-IFOAM Report. IFOAM. and FiBL. Frick. (2012): 277-282.
- 17 National Organic Union Media Review. *Organics*. (2018): 10.
- 18 Grigoruk V.V., Klimov E.V. Development of organic agriculture in the world and Kazakhstan. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Ankara. (2016): 3.

- 19 Internet link: The market for organic products has exceeded 106 billion US dollars and beaten the arms market, while in Kazakhstan, on the contrary, the acreage for organic products is decreasing (-25%). 11.11.2020. URL: www.energyprom.kz/ru/a/monitoring/rynok-organicheskoy-produkcii-prevysil-106-milliardov-dollarov-ssha-i-obognal-rynok-vooruzheniya (11.11.2020).
- 20 Internet link: Certification as a tool to boost organic food development in Kazakhstan. 17.06.2020. URL: www.undp.org/kazakhstan/news/certification-tool-boost-organic-food-development-kazakhstan (17.06.2020).
- 21 Aitbayev T.E., Mamyrbekov Zh.Zh., Aitbayeva A.T., Turegeldiyev B.A., Rakhymzhanov, B.S. The influence of biorganic fertilizers on productivity and quality of vegetables in the system of «green» vegetable farming in the conditions of the south-east of Kazakhstan. *OnLine Journal of Biological Sciences*. No. 18(3). (2018): 277-284. DOI: 10.3844/ojbsci.2018.277.284.
- 22 Dospekhov B.A. Method of field experiment (with the basics of statistical processing of research results). Moscow, Kolos. (1985): 418.
- 23 Methodology of experimentation in vegetable growing and melon cultivation (edited by V.F. Belik). Moscow. (1992): 320.
- 24 Gutsalyuk T.G. Method for breeding watermelon and melon. Kainar. (1998): 4-29.
- 25 Kaleboshina T.G., Belov S.I. New agricultural practices of watermelon cultivation and its influence on the yield and quality of watermelon fruits in Volgograd Zavolzhye. *Proceedings of the Nizhnevolzhsk Agricultural University Complex: Science and higher professional education*. No. 3 (39). (2015): 60-64.
- 26 Agafonova E.V., Barykina V.S., Guzhvina S.A. and Chernova A.Ya. The efficacy of combined application of mineral and bacterial fertilizers for watermelon. *Bulletin of Agrarian Science of the Don*. No. 1. (2010): 76-85.
- 27 Medvedev G.A., Tarassova E.M. The effects of biologically active substances in the cultivation of cucurbits. *Proceedings of the Nizhnevolzhsk Agricultural University Complex*: No.1 (17). (2010): 2-8.

МРНТИ 34.35.01

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v92.i3.03>Т.А. Вдовина , О.А. Лагус* 

РГП на ПХВ «Алтайский ботанический сад» КН МОН РК, Казахстан, г. Риддер

*e-mail: lelik_ridder1994@mail.ru

ХОЗЯЙСТВЕННО-ИНТРОДУКЦИОННАЯ ОЦЕНКА СОРТОВ И ФОРМ ЧЕРЕМУХИ *PADUS* MILL. В АЛТАЙСКОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ

В Алтайском ботаническом саду изучены эколого-биологические особенности у 32 сортов и форм черемухи. В результате было установлено, что современные формы и сорта черемухи превосходят наши дикорастущие формы по урожайности, размеру и вкусу плодов, декоративности. Оценка черемухи по комплексу хозяйственно-биологических и декоративных признаков показала полную возможность возделывания ее в климатических условиях Восточного Казахстана. Для внедрения в приусадебные, коллективные сады и в озеленение рекомендуются следующие сорта и формы: Августина, Валенсия, Гранатовая гроздь, Памяти Саламатова, Мавра, Поздняя радость, Пурпурная свеча, Самоплодная, 14-1-51, 14-2-34, 13-8-60, 14-1-62, 13-14-1, 14-3-31, 54-1-34.

Начато изучение внутривидовой изменчивости черемухи обыкновенной (кистевой) в природе, выделено 4 формы. Все они с белой окраской лепестков, 8-10 мм в диаметре, собранные в плотные кисти. Для местного вида характерны мелкие плоды с вяжущим, кислым вкусом.

Цель исследования заключалась в выделении хорошо адаптированных к местным условиям высокодекоративных и пищевых форм и сортов черемухи, интродуцированных из Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) г. Новосибирска, отборе форм в природе.

Ключевые слова: форма, сорт, изменчивость, коллекция, черемуха, признак.

Т.А. Вдовина, О.А. Лагус*

Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің

«Алтай ботаникалық бағы» шаруашылық жүргізу құқығындағы

Республикалық мемлекеттік кәсіпорны, Қазақстан, Риддер қ.

*e-mail: lelik_ridder1994@mail.ru

Алтай ботаникалық бағында *Padus* Mill. құс шиесінің сорттары мен формаларын шаруашылық-интродукциялық бағалау

Алтай ботаникалық бағында құс шиесінің 32 сорты мен формаларының экологиялық және биологиялық ерекшеліктері зерттелген. Нәтижесінде құс шиесінің заманауи формалары мен сорттары жемістердің шығымдылығы, мөлшері мен дәмі, сәнділігі бойынша біздің жабайы түрлерімізден асып түсетіні анықталды. Құс шиесінің шаруашылық-биологиялық және сәндік белгілерінің кешені бойынша бағалау оны Шығыс Қазақстанның климаттық жағдайында өсірудің толық мүмкіндігін көрсетті. Үй бақшаларына, ұжымдық бақтарға және көгалдандыруға енгізу үшін келесі сорттар мен формалар ұсынылады: Августин, Валенсия, Анар шоғыры, Саламатовты еске алу, Мавр, кеш қуаныш, күлгін шам, өздігінен құнарлы, 14-1-51, 14-2-34, 13-8-60, 14-1-62, 13-14-1, 14-3-31, 54-1-34.

Табиғатта қарапайым (карпальды) құс шиесінің ішкі өзгергіштігін зерттеу басталды, ол 4 формаға бөлінді. Олардың барлығы жапырақшалардың ақ түсімен, диаметрі 8-10 мм, тығыз щеткаларда жиналған. Жергілікті түрлер тұтқыр, қышқыл дәмі бар кішкентай жемістермен сипатталады. Зерттеудің мақсаты Новосибирск қаласындағы Ресей Ғылым академиясының Сібір филиалының Орталық Сібір ботаникалық бағынан енгізілген жоғары сәндік және тағамдық формалар мен құс шиесі сорттарын жергілікті жағдайларға жақсы бейімдеу болды. Табиғаттағы формаларды таңдау.

Түйін сөздер: пішіні, әртүрлілігі, өзгергіштігі, коллекциясы, құс шиесі, ерекшелігі.

T.A. Vdovina, O.A. Lagus

The Republican State Enterprise on the right of economic management "Altai Botanical Garden"
of the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan
Republic of Kazakhstan the city of Ridder
*e-mail: lelik_ridder1994@mail.ru

**Economic and introduction assessment of varieties
and forms of bird cherry *Padus* Mill.
In the Altai botanical garden**

Abstract. Ecological and biological features of 32 varieties and forms of bird cherry have been studied in the Altai Botanical Garden. As a result, it was found that modern forms and varieties of cherry trees surpass our wild forms in yield, size and taste of fruits, decorative. The assessment of bird cherry by the complex of economic, biological and decorative features showed the full possibility of its cultivation in the climatic conditions of Eastern Kazakhstan. The following varieties and forms are recommended for introduction into household, collective gardens and landscaping: Augustine, Valencia, Pomegranate bunch, Memory of Salamatov, Moor, Late joy, Purple candle, Self-fertile, 14-1-51, 14-2-34, 13-8-60, 14-1-62, 13-14-1, 14-3-31, 54-1-34.

The study of the intraspecific variability of the common bird cherry (carpal) in nature has begun, 4 forms have been identified. All of them have white colored petals, 8-10 mm in diameter, collected in dense brushes. The local species is characterized by small fruits with astringent, sour taste. The purpose of the research was to identify highly decorative and edible forms and varieties of bird cherry, well adapted to local conditions, introduced from the Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (CSBS SB RAS) in Novosibirsk. Selection of forms in nature.

Key words: form, variety, variability, collection, bird cherry, feature.

Введение

Интродукция и изучение черемухи – *Padus* Mill. имеют большое хозяйственное и экономическое значение. Селекция черемухи, как плодовой культуры, была начата в первой четверти XX века И.В. Мичуриным и И.П. Бедро [1, с. 826]. Ими получены крупноплодные гибридные формы черемухи виргинской. Позже, во второй четверти XX века, работа по селекции черемухи виргинской начата на Бакчарском опорном пункте северного садоводства НИИСС им. М.А. Лисавенко. Здесь были получены первые сорта черемухи – Рассвет, Нарым, Тайга. Расширенные работы по гибридизации черемухи проводятся в Центральном сибирском ботаническом саду, Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) г. Новосибирска, в Государственном научном учреждении «Крымская опытная селекционная станция» г. Крымск-4 [2, 3]. В последние годы здесь создано много декоративных и пищевых сортов этой культуры, некоторые из них (в количестве 32 сортов и отборных форм) впервые привлечены в коллекцию плодовых и ягодных культур Алтайского ботанического сада. Эти отборные формы и сорта созданы на основе генетического потенциала местного вида черемухи обыкновенной (кистевой) – *Padus avium* Mill. и североамериканско-

го вида черемухи виргинской – *Padus virginiana* (L.) Mill. [4].

Черемуха (*Padus* Mill.) используется в лекарственных, декоративных и пищевых целях. Вследствие содержания довольно большого количества дубильных веществ и фитонцидов черемуха обладает ярко выраженным вяжущим и противовоспалительным действием [5–7]. В медицине широко используются цветки, плоды, листья и кора этого растения. Лечебно-профилактические и диетические свойства плодов черемухи обусловлены содержанием в них большого количества биологически активных веществ. По литературным данным А.В. Локтева, R.G. St. Pierre [8–10] в плодах черемухи обыкновенной содержатся сахара – 7 – 17% (из них: фруктоза – 4,4 – 6,4%, глюкоза – 5,3 – 6,3%, сахароза – 0,06 – 0,62%), пектиновые вещества – 0,5 – 1,3%, органические кислоты (лимонная, яблочная и др.), аскорбиновая кислота – до 32,7 мг%, Р-активные вещества – 1,5 – 8%, токоферолы (витамин Е), каротины – 0,2 – 0,5%, гликозиды, жирные и эфирные масла, микроэлементы (фосфор – 94 мг%, калий – 63 мг%, кальций – 33 мг%, а так же в заметных количествах натрий, магний, железо, марганец, алюминий, кремний; в меньшей степени медь, йод, стронций, барий, свинец, молибден, кобальт, цинк) [11–14].

Материалы и методы

Объектом исследования послужили 32 отборных формы и сорта черемухи селекции Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук (ЦСБС СО РАН) г. Новосибирска, которые были интродуцированы в 2012 г. Изучение биологических и хозяйственных признаков черемухи проводили по «Программе и методике сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур» [15, с. 303], а также учебному пособию – «Селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур» под редакцией профессора А.С. Татаринцева [16, с. 366].

Для оценки степени изменчивости признаков использовали унифицированную шкалу уровней изменчивости, разработанную С.А. Мамаевым, Л.Ф. Правдиным, М.А. Щербаковым [17, с. 31]. Согласно шкале амплитуду изменчивости оценивали по величине коэффициента вариации: меньше 12% – уровень изменчивости низкий, 13% – 20% – средний, 21% – 40% – высокий, более 40% – очень высокий. При повышении коэффициента вариации при индивидуальной изменчивости повышается шанс отбора перспективных форм. По каждому растению полученные цифровые данные обрабатывали, применяя методы математической статистики по Б.А. Доспехову [18, с. 412].

Степень цветения и плодоношения оценивали по 5 - бальной системе: 1 – очень слабое; 2 – слабое; 3 – среднее; 4 – хорошее; 5 – обильное. Окраску побегов, цветков, листьев устанавливали по шкале цветов А.С. Бондарцева [19, с. 28], при этом указывали интенсивность оттенка. Оценка вкуса плодов определялась органолептическим методом.

Распределение растений по качественным признакам проводили на основании большого фактического материала, полученного при изучении черемухи. Для выделения перспективных форм по каждому изучаемому показателю данные были разбиты на классы с наименьшими, средними и наибольшими значениями. Так, учитывая лимиты по массе плодов у растений черемухи от 0,38 г до 1,10 г, в градации был принят интервал в 0,24 г, получены три группы: мелкие – 0,38 – 0,62 г; средние – 0,63 – 0,87 г; крупные – 0,88 – 1,10 г. У большинства плодов не очень разнятся длина и диаметр, поэтому для этих признаков применяли одну и ту же градацию: небольшой размер плодов – 7,5 – 8,7 мм; средний – 8,7 – 10,0 мм; большой – 10,03 – 11,29

мм. Вариации составляли от 7,5 мм до 11,3 мм. Характер отрыва плодов с кисти сухой и с мякотью [20].

Распределение растений черемухи по длине кисти было следующим: длинная от 12,4 до 15,3 см; средняя от 9,7 до 12,4 см; короткая от 6,7 до 9,6 см. В градации был принят интервал в 2,86 см, исходя из вариаций по длине кисти от 6,7 до 15,3 см. По количеству цветков в кисти вариации составили от 19,3 до 33,6 шт. В градации был принят интервал в 4,7 шт. Распределение выполнено по трем группам: малое количество цветков – 19,3 – 24,0 шт.; среднее 24,1 – 28,7 шт.; большое 28,8 – 33,6 шт. Учитывая лимиты по количеству плодов в кисти – 4,6 – 12,2 шт., в градации был принят интервал в 2,53 шт. Также получено три группы: малое количество плодов – 4,6 – 7,1 шт.; среднее – 7,2 – 9,7 шт.; большое – 9,8 – 12,3 шт.

По размерам листовой пластинки получены следующие лимиты – 5,86 – 8,71 см, в градации был принят интервал в 0,95 мм. В результате получено следующее распределение: длинная от 7,77 – 8,71 см; средняя от 6,82 – 7,76 см; короткая – от 6,81 – 5,86 см. Вариации по ширине листовой пластинки – 5,86 – 8,71 см, в градации был принят интервал в 0,74 мм и получено следующее распределение: широкая от 4,26 – 4,99 см; средняя от 3,51 – 4,25 см; узкая – от 2,76 – 3,50 см.

Результаты и обсуждение

Изучение эколого-биологических особенностей черемухи в Алтайском ботаническом саду позволило получить следующие характеристики. Жизненная форма сортов и форм черемухи представляет кустарник или дерево до 5,0 м высотой. Черемуха относится к быстрорастущей культуре. Легко размножается вегетативно, семенами и *in vitro* [21-26]. В первые годы после посадки растений на постоянное место у всех сортов и форм отмечен интенсивный рост побегов, средняя длина побегов в зависимости от сорта или формы составила от 28 до 100 см. Высота большинства растений черемухи в течение трех-четырех лет (возраст 5 – 7 лет) достигла 1,5 – 2,3 м. В последующие годы, с возрастом, прирост уменьшился и к десяти годам у некоторых форм и сортов отмечен в пределах 12 – 28 см, высота достигла 4,2– 5,0 м. Самый слабый прирост от 3 до 18 см наблюдался в 2021 г, исключением явился сорт Черный Крест, прирост которого составил 30 см. Рост побегов начинается через три

недели после распускания почек и продолжается 2 – 3 месяца. Наиболее интенсивно побеги увеличивают свою длину в течение первого месяца, в конце мая – начале июня прирост достигает 70 – 81% своей окончательной длины.

При оценке адаптивных свойств черемухи в резко континентальном климате с холодными продолжительными зимами, нередко достигающими критической отметки 40 – 42°C и неоднократными оттепелями с перепадами температур в 18 – 20°C получен высокий показатель экологической пластичности. Большинство сортов и форм черемухи имеют наиболее высокую морозостойкость среди косточковых плодовых растений. Низкая зимостойкость отмечена лишь у двух форм 14-3-31, 14-7-14 с подмерзанием многолетних ветвей. Состояние растений черемухи после зимних периодов хорошее на 4 и 5 баллов.

Фенологические наблюдения за период исследований показали, что сроки наступления фаз у сортов и отборных форм черемухи определяются комплексным взаимодействием метеорологических условий года и биологическими особенностями. Начало вегетации в наших условиях приходится в среднем на вторую половину апреля, цветение – на вторую половину мая. Первое единичное цветение на четвер-

тый год отмечено у трех сортов: Розовая, Гранатовая гроздь, Поздняя радость и двух форм 14-6-61, 14-4-37. У ранних сортов цветение отмечается в середине мая (14 – 16) и продолжается 8 – 12 дней. Поздние сорта цветут в третьей декаде мая (20 – 26 мая). Как правило, в этот период отмечается повышение температуры до 25 – 28°C и продолжительность цветения сокращается на 3 – 4 дня. Большинство сортов черемухи с белой окраской венчика. У других же окраска варьирует по тональности от нежно-розовой до сиреневой.

По срокам созревания плодов сорта и формы разделены на три группы: ранние, средние и поздние. К ранним сортам относятся Валенсия, Самоплодная, к позднеспелым – Августина, Мавра, Поздняя радость и отборная форма 14-1-51. Остальные сорта и формы являются среднеспелыми. На протяжении всех лет исследований высокая урожайность отмечена у сортов: Августина, Гранатовая гроздь, Валенсия, Памяти Саламатова, Пурпурная свеча, Мавра и форм 14-1-51, 14-7-2-34, низкая – у форм 14-5-35, 14-7-14.

Масса плодов – важный показатель, отражающий продуктивность растений. Крупные плоды, массой 0,88 – 1,10 г, имеют формы 13-4-91, 14-2-34, 14-1-18, 13-8-60 (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика хозяйственных и морфологических признаков перспективных форм и сортов черемухи – *Padus* Mill.

Сорт, форма	Длина кисти, см	Количество цветков в кисти, шт.	Количество плодов в кисти, шт.	Масса плодов, г	Размер плодов, мм		Размеры листа, см	
					Длина	Диаметр	Длина	Ширина
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Августина (M±m) С% Р%	6,7±0,9 21,5 6,8	26,0±2,7 15,6 4,9	7,6±1,0 24,1 6,5	0,55±0,02 4,7 3,5	8,9	9,0	6,9±0,6 11,3 4,3	3,7±0,3 9,9 3,7
Валенсия (M±m) С% Р%	9,2±0,8 13,9 4,4	23,0±1,5 9,8 3,1	4,6±0,7 23,4 7,4	0,76±0,02 4,9 1,6	9,8	9,9	7,6±0,8 17,8 5,2	4,3±0,44 16,9 4,9
Гранатовая гроздь (M±m) С% Р%	7,7 ±0,4 6,9 2,2	29,3 ±1,6 8,4 2,6	6,4±1,2 23,5 8,9	0,38±0,01 4,2 2,5	7,5	7,5	6,1±0,4 9,1 2,9	2,9±0,2 10,1 3,2
Мавра (M±m) С% Р%	10,7 ±0,7 10,2 3,2	29,8 ±1,4 7,2 2,3	12,2±1,2 16,7 4,8	0,49±0,02 12,4 4,7	8,5	8,0	6,6±0,4 10,2 2,7	2,8±0,1 9,2 2,4
Памяти Саламатова (M±m) С% Р%	12,9 ±0,9 10,6 3,3	33,2 ±2,1 9,5 3,0	4,2±0,6 21,0 6,8	0,40±0,01 4,6 2,8	7,4	7,3	6,9±0,4 8,0 2,5	3,8±0,3 10,7 3,4

Продолжение таблицы

Сорт, форма	Длина кисти, см	Количество цветков в кисти, шт.	Количество плодов в кисти, шт.	Масса плодов, г	Размер плодов, мм		Размеры листа, см	
					Длина	Диаметр	Длина	Ширина
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Поздняя радость (M±m) C% P%	7,0 ±0,5 8,2 3,1	30,6 ±1,6 6,5 2,5	11,8±1,1 17,3 6,0	0,42±0,02 5,2 5,0	7,6	7,5	8,7±0,9 13,3 5,0	4,6±0,3 8,3 3,1
Пурпурная свеча (M±m) C% P%	12,0±0,7 10,9 3,6	27,9±1,5 8,2 4,0	9,29±1,0 20,4 4,94	0,54±0,01 4,9 4,8	9,8	8,9	5,9±0,4 8,6 3,3	3,5±0,4 15,9 6,0
Розовая (M±m) C% P%	7,9±0,4 7,8 2,5	26,0 ±1,8 10,7 3,4	9,3±1,9 30,9 9,8	0,49±0,02 5,6 2,9	8,8	8,0	7,7±1,1 17,8 6,7	3,7±0,5 17,1 6,5
Самоплодная (M±m) C% P%	13,2±0,6 7,4 2,3	19,3 ±1,1 8,5 2,7	5,7 ±0,7 27,9 6,3	1,1±0,01 6,0 2,8	10,7	11,3	7,5±1,1 10,2 5,9	3,9±0,4 16,2 4,8
Черный крест (M±m) C% P%	8,8±0,9 15,4 4,9	28,0 ±4,2 22,5 7,1	7,4±0,6 22,0 4,8	0,53±0,01 4,9 2,7	8,0	7,9	7,6±0,5 10,6 3,4	4,5±0,4 12,6 3,9
13-4-91 (M±m) C% P%	8,5 ±1,4 25,1 7,9	22,3 ±3,4 22,9 7,3	8,7±0,6 21,5 6,4	1,04±0,02 6,0 6,2	10,6	10,7	6,9±0,7 11,9 4,5	4,6±0,4 11,4 4,3
14-1-51 (M±m) C% P%	8,9 ±0,7 11,1 3,5	23,7 ±2,7 17,5 5,5	8,5±1,3 32,9 7,4	0,68±0,01 4,8 3,6	9,6	9,4	6,8±0,5 11,6 3,7	3,4±0,2 6,5 2,0
13-8-60 (M±m) C% P%	13,5 ±0,4 4,9 1,6	33,4 ±2,8 12,6 3,9	6,4 ±0,4 14,7 3,3	0,84±0,02 8,7 4,9	11,5	10,6	7,8±0,7 11,6 4,4	4,9±0,3 6,8 2,6
54-1-34 (M±m) C% P%	10,8 ±0,3 3,9 1,2	29,3 ±2,3 11,8 3,7	6,9 ±0,9 27,7 6,2	0,58±0,02 7,2 3,6	7,9	8,0	7,9±0,7 12,8 4,1	4,5±0,5 15,5 4,9
13-14-1 (M±m) C% P%	11,9 ±0,8 10,7 3,4	31,7 ±3,8 18,2 5,8	7,4±1,1 27,9 7,5	0,49±0,02 7,9 4,8	7,8	7,7	7,5±0,7 14,5 4,2	4,0±0,4 15,2 4,4
14-1-62 (M±m) C% P%	13,8 ±1,3 13,8 4,4	32,6 ±1,9 9,2 2,9	6,2±0,9 18,9 10,0	0,44±0,01 8,0 6,7	7,6	7,5	8,4±0,6 10,2 3,2	4,9±0,3 9,4 2,9
14-1-18 (M±m) C% P%	11,1±0,9 11,7 4,0	30,9±2,4 10,2 6,0	5,3±0,7 24,8 6,0	0,85±0,02 11,3 4,3	10,8	10,9	7,9±0,6 11,8 4,9	4,8±0,5 14,9 2,7
14-2-34 (M±m) C% P%	10,9±0,4 7,8 2,6	24,8±1,6 10,0 3,2	9,5±1,2 26,0 5,8	0,93±0,03 20,1 4,8	10,5	10,9	7,1±0,7 14,2 0,7	3,5±0,3 11,9 3,8

Средние плоды, массой 0,63 – 0,87 г отмечены у сортов: Валенсия, Самоплодная и форм 14-1-51, 54-1-34. Мелкие плоды от 0,38 до 0,62 г характерны для сортов: Красная, Августина, Пурпурная свеча, Мавра, Гранатовая гроздь, Розовоцветковая. Диаметр плодов черемухи в зависимости от сорта или формы колебался в пределах – 7,5 – 11,3 мм. Наибольший диаметр плодов (10,0 – 11,3 мм) имели следующие формы: 13-14-1, 14-2-34, 14-1-18 и сорта: Валенсия, Самоплодная. Небольшой диаметр плодов (7,05 – 8,75 мм) отмечен у сортов Августина, Мавра, Гранатовая гроздь.

Завязываемость плодов черемухи в условиях свободного опыления показала высокую вариативность данного признака. Большое количество плодов в кисти от 9,8 до 12,3 шт. отмечено у сортов: Красная, Пурпурная свеча, Мавра, Розовоцветковая. Среднее количество плодов в кисти от 7,2 до 9,7 шт. имели Августина, 14-1-51, 14-2-34. Малое количество плодов меньше 7,1 шт. у остальных. Длинные кисти от 12,4 до 15,2 см отмечены у сортов Розовоцветковая, Пурпурная свеча, Самоплодная, 14-1-62 (Фейерверк), 14-8-35; средние от 9,7 до 12,4 см у сортов Валенсия, Гранатовая гроздь, Красная, Мавра, 14-1-51, 14-2-34, 14-1-18, 14-3-64, 14-1-51, 54-1-34, 13-14-1; короткая кисть от 6,7 до 9,6 см – у сортов Августина, Поздняя радость и формы 13-4-91.

При полном созревании у плодов преобладает черная окраска. Зрелые плоды сорта Гранатовая гроздь – темно-бордовые. Цвет мякоти большинства плодов желтый или зеленый с различными оттенками и переходами между этими двумя цветами. Наиболее высокими вкусовыми качествами отличаются Августина, Мавра, Поздняя радость, Черный крест, 14-2-34, 13-4-91, 14-1-18. На небольшую долю косточки в плодах претендуют Гранатовая гроздь, Плотнокистная, Поздняя радость, Самоплодная.

Результаты многолетнего изучения продуктивности сортов и отборных форм черемухи показали, что стабильно высокие значения по большинству показателей – урожайности, количеству плодов в кисти, массе плодов, имеют следующие сорта: Августина, Валенсия, Гранатовая гроздь, Поздняя радость, Пурпурная свеча, Мавра, Памяти Саламатова, Черный крест, Самоплодная и отборные формы 14-1-51, 14-2-34, 14-1-51.

Одновременно проводили отбор высокодекоративных форм и сортов по форме кроны, по степени цветения, длине кисти, величине и количеству цветков, диаметру кисти, окраске пло-

дов и листьев. Учитывали привлекательность сорта и формы в разные фазы развития. В нашей коллекции есть образцы, сочетающие оригинальность кроны с другими ценными декоративными качествами. Ранней весной номерной гибрид 14-1-52 имеет декоративный вид за счет бордовой окраски скелетных ветвей, сорт Гранатовая гроздь выделяется пышной кроной за счет большого количества стволиков и темно-бордовой окраской побегов.

Немаловажную роль при оценке декоративных качеств играет окраска листа. Наряду с типичными зеленолиственными растениями существуют формы с повышенным содержанием антоцианов. Наиболее интересны растения с красными и пурпурно-красными листьями – это сорта: Гранатовая гроздь, Пурпурная свеча и форма 13-14-12. Зеленовато-карминными листьями выделяется 14-3-31, темно-зеленые листья у сортов: Поздняя радость, Черный крест и форм 13-8-60, 3-8-11. У последнего с нижней стороны листья светло-зеленые. Интересная окраска листа у формы 13-14-1, верхняя сторона которого темно-зеленая, а нижняя бордовая.

Цветение черемухи позволило выделить несколько декоративных форм и сортов, которые могут использоваться в декоративном садоводстве. Ежегодно обильное цветение отмечено у сортов Августина, Валенсия, Гранатовая гроздь, Самоплодная, Мавра, Поздняя Радость, 13-8-60, 14-1-51, 14-2-34. Формы 13-8-60 и 14-1-62 имеют привлекательный декоративный вид за счет одновременного набухания крупных бутонов по всей длине кисти (этим формам мы условно дали названия вологодские кружева). Нежно-сиреневой окраской цветков выделяются номерные гибриды 13-14-1, 14-3-31 у последнего диаметр кисти по всей длине равен 2,0 см, а цветкам присущ амигдолиновый, косточковый аромат. У формы 13-8-11 кисть ажурная, тонкая в диаметре 1,8 – 2,0 см. Сорт Розовая выделяется нежно розовыми лепестками. Очень красивые цветки, белые с лимонной серединкой у формы 54-1-34, у нее лепестки слегка завернуты внутрь. Бахромчатое рассечение лепестков у сорта Памяти Саламатова придает воздушность кисти. Изучение отборных форм и сортов черемухи по комплексу хозяйственно-биологических признаков и декоративным качествам позволило выделить следующие сорта и формы:

Августина. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск). Зимостойкость сорта высокая. Дерево высокорослое, 2,8 – 3,2 м, с широкопирамидальной кроной. Количество стволиков 4 – 8 шт. В

первые годы наблюдается интенсивный рост побегов от 28 до 61 см. В дальнейшем наблюдается затухание ростовых процессов, средний прирост в последние годы составляет 8 – 12 см. Окраска побегов светло-бурая. Листья средние, длиной $6,91 \pm 0,62$ см, шириной $3,70 \pm 0,29$ см, овальные, с заостренной верхушкой и мелкой острой зазубренностью, зеленые. Размеры листа варьируют незначительно, коэффициент вариации 9 – 11%. Черешки длинные, средней толщины интенсивно окрашены в бордовый цвет. Цветение ежегодное на 4 балла, продолжается 7 – 10 дней. Кисть короткая, длиной $6,7 \pm 0,9$ см, коэффициент вариации 21,5%, узкая 1,5 см в диаметре, светло-зеленая. Сорт отличается расположением кистей в мутовках. Цветки мелкие их количество среднее $26,0 \pm 2,7$ шт., коэффициент вариации 15,6%. Плоды средней величины, масса 100 плодов $51,9 - 54,0$ г, шаровидной формы, длиной 8,9 мм, диаметром 9,0 мм. Количество плодов в кисти среднее $7,6 \pm 0,1$ шт., коэффициент вариации 24,1%. Урожайность 4,2 кг/куст. По своим характеристикам сорт универсален.

Валенсия. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск). Сорт зимостойкий. Высота растений 3,0 – 3,5 м. Средний прирост в последние годы 30 см. Листья крупные, длиной $7,66 \pm 0,83$ см, шириной $4,25 \pm 0,44$ см, овальные, с заостренной верхушкой и мелкой острой зазубренностью, зеленые. Размеры листа варьируют на среднем уровне изменчивости 17 – 18%. Почки крупные, выдвижение цветочных бутонов наблюдается в конце апреля (22-28). Цветение ежегодное на 5 баллов, обычно продолжается 10 – 12 дней. У этого сорта весь куст снизу доверху усыпан белыми, крупными цветками. Цветки источают неповторимый аромат. Кисть длинная, пушистая, с 3 – 4 листиками, тонкая. Длина кисти средняя $9,2 \pm 0,8$ см, коэффициент вариации 13,9%; диаметр цветка 2,0 см. Количество цветков низкое и среднее $23,0 \pm 1,5$ шт., коэффициент вариации 9,8%. Плоды средней величины, масса 100 плодов колеблется в пределах от 70 до 76 г. Плоды почти шаровидной формы, длиной 9,8 мм, диаметром 9,9 мм. Количество плодов в кисти небольшое $7,6 \pm 0,7$ шт., коэффициент вариации 23,4%. Урожайность 3,0 – 3,8 кг/куст. Вкус плодов с кислинкой. По своим характеристикам сорт универсален.

Поздняя радость. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск) путем скрещивания в 1981 г. отборной формы черемухи виргинской 1-5-13 с отборной формой черемухи кистевой 5-28-10.

Авторы: В.С. Симагин, В.П. Белоусова, О.В. Симагина. Дерево высокорослое, 3 м, с пирамидальной кроной. Впервые годы наблюдается интенсивный рост побегов от 30 до 65 см. В дальнейшем отмечено затухание ростовых процессов, средний прирост в последние годы составляет 10 – 14 см. Побеги бурые. Листья крупные, длиной $6,91 \pm 0,62$ см, шириной $3,70 \pm 0,29$ см, темно-зеленые, овальные, со средней острой зазубренностью. Размеры листа варьируют следующим образом, длина листа на среднем уровне изменчивости, коэффициент вариации 13,2%, ширина листа на низком, коэффициент вариации 8,2%. Первое цветение отмечено на четвертый год. Цветение дружное, позднее в конце мая. Кисть короткая, $7,0 \pm 0,5$ см, коэффициент вариации 8,2%. Количество цветков большое, $30,6 \pm 1,6$ шт., коэффициент вариации 6,5%. У этого сорта из-за большого количества цветков (на 1 см длины кисти приходится 4 – 5 шт.) кисть плотная. Урожайность 4,8 кг/куст. По своим характеристикам сорт универсален.

Пурпурная свеча. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск). Куст с пирамидальной кроной, высокий, 3,2 м. Однолетние побеги тонкие. Сорт имеет интенсивную пурпурно-красную окраску листьев. Лист в молодом возрасте очень крупный до 12 см в длину, в дальнейшем средний – длиной $6,13 \pm 0,52$ см, шириной $4,02 \pm 0,39$ см, широкоовальный, с заостренной верхушкой и мелкой острой зазубренностью. Размеры листа варьируют на среднем уровне изменчивости, коэффициент вариации 13 – 15%. Черешки длинные, средней толщины, интенсивно окрашены в бордовый цвет, жилкование также выделяется интенсивным бордовым цветом. Прирост побегов в первые годы до 58,7 см, в последующие – (8 – 12 см). Кисти тяжелые, толстые, длинные $12,0 \pm 0,7$ см, коэффициент вариации 10,9%. Количество плодов среднее, $9,29 \pm 1,0$ шт., коэффициент вариации 20,4%. Урожайность 3,9 кг/куст. По своим характеристикам сорт универсален.

Мавра. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск). Дерево высокорослое 4 м, с пирамидальной кроной. Побеги в молодом возрасте длиной от 28 до 61 см, бурые. Листья мелкие, длиной $6,55 \pm 0,36$ см, шириной $2,76 \pm 0,14$ см, зеленые, ланцетовидной формы, с мелкой острой зазубренностью, на многолетних ветвях часто расположены мутовкой. Цветение ежегодное на 4 балла. Его продолжительность составляет 7 – 9 дней. Кисти светло-зеленые, тонкие, на по-

бегах расположены в мутовках. Кисть длинная $10,7 \pm 0,7$ см, коэффициент вариации 6,9%. Количество цветков большое $29,8 \pm 1,4$ шт., коэффициент вариации 7,2%. Масса плодов средняя, 0,72 г. Урожайность 3,0 – 4,1 кг/куст. По своим характеристикам сорт универсален.

14-1-51. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск). Высота 3,0 м. Листья средние, длиной $6,83 \pm 0,53$ см, шириной $3,43 \pm 0,15$ см, ланцетовидные, с заостренной верхушкой и мелкой острой зазубренностью, зеленые. Размеры листа варьируют незначительно, на низком уровне изменчивости, коэффициент вариации по длине листа составляет 11,6%, по ширине 6,4%. Цветение дружное 5 баллов. Продолжительность цветения 7 – 10 дней. Кисть средняя длиной $8,9 \pm 0,7$ см, коэффициент вариации 11,1%. Количество цветков, $23,7 \pm 2,6$ шт., коэффициент вариации 17,5%. Плоды почти шаровидной формы, крупные их размеры: длина 9,6 мм, диаметр 9,4 мм. Количество плодов в кисти среднее $8,5 \pm 1,3$ шт., коэффициент вариации 32,9%. Плоды средние, масса плодов 100 плодов – 61,7 – 64,0 г. Плоды вкусные. Максимальная урожайность 5,8 кг/куст. По своим характеристикам форма универсальна.

14-2-34. Форма получена из ЦСБС (г. Новосибирск). Высота 3,4 м. Растения с овальной кроной. Листья средние, длиной $7,12 \pm 0,67$ см, шириной $3,50 \pm 0,28$ см, овальные, с заостренной верхушкой и мелкой острой зазубренностью, зеленые. Черешки окрашены в бордовый цвет. Размеры листа варьируют на среднем уровне изменчивости, коэффициент вариации 13 – 14%. Цветение дружное 5 баллов. Продолжительность цветения 8 – 10 дней. Длина кисти средняя $11,5 \pm 0,8$ см, коэффициент вариации 14,4%. Количество цветков, $31,7 \pm 2,6$ шт., коэффициент вариации 18,6%. Плоды почти шаровидной формы, крупные их размеры: длина 10,5 мм, диаметр 10,9 мм. Количество плодов в кисти среднее $9,5 \pm 1,3$ шт., коэффициент вариации 25,9%. Плоды крупные, масса плодов 100 плодов – 93,4 – 96,1 г, сладкие имеют легкий отрыв. Урожайность – 2,6 кг/куст. По своим характеристикам форма универсальна.

13-8-60. Сорт выведен в ЦСБС (г. Новосибирск). Высота 4,3 м. Крона овальная. Листья крупные, длиной $7,84 \pm 0,72$ см, шириной $4,90 \pm 0,26$ см, овальные, с заостренной верхушкой и мелкой острой зазубренностью, темно-зеленые. Размеры листа варьируют следующим образом, длина листа на среднем уровне измен-

чивости 12,5%, ширина на низком – 6,7%. Цветение дружное 4 – 5 баллов. Продолжительность цветения 9 дней. Кисть длинная $11,8 \pm 0,6$ см, коэффициент вариации 12,3%. Количество цветков, $30,2 \pm 2,5$ шт., коэффициент вариации 17,6%. Плоды почти шаровидной формы, крупные, их размеры: длина 11,5 мм, диаметр 10,6 мм. Количество плодов в кисти среднее $11,5 \pm 1,2$ шт., коэффициент вариации 23,7%. Иногда плоды обрываются с кисточкой, и ее приходится придерживать. Плоды крупные, масса плодов 100 плодов – 84,4 – 87,0 г, сладкие, каплевидной формы, имеют легкий отрыв. Косточка крупная, на косточке остается мякоть. Урожайность – 2,9 кг/куст. По своим характеристикам форма универсальна.

В связи с повышенным интересом к работам по селекции черемухи начато изучение хозяйственно-биологических признаков черемухи обыкновенной (кистевой) - *Padus avium* Mill. в природных условиях. Черемуха на участке плодовых и ягодных культур (естественная растительность) представлена высокими многоствольными кустарниками до 6 – 7 м высотой, разросшимися за счет многочисленных корневых отпрысков. Этот вид зимостоек, лишь в суровые зимы отмечается подмерзание однолетних побегов. Фенологические наблюдения за черемухой на территории Алтайского ботанического сада показали синхронность по срокам наступления основных фаз развития с формами и сортами черемухи, выведенными на основе местного вида – черемухи обыкновенной. Цветение отмечено в конце мая - начале июня. Продолжительность цветения обычно в течение 5 – 9 дней; созревание плодов в конце июля; рост побегов с первой декады мая до конца июня – начала июля. Побеги одревесневают полностью к концу июля. Величина прироста за вегетационный период варьирует от 12,6 до 24,3 см. В конце сентября листья неравномерно окрашиваются в желтый цвет, и в октябре отмечается листопад. В природе (подножье хр. Ивановский, Первый кордон) фенологические фазы отмечены на неделю позднее.

На территории Алтайского ботанического сада и у подножия хр. Ивановский отмечены формы только с белой окраской лепестков, 8-10 мм в диаметре, собранные в плотные кисти. Плоды округлые, средние значения по формам (длина 7,6 мм, диаметр 7,4 мм) – на территории сада, у подножия хр. Ивановский, первый Кордон - 7,1 - 6,9 мм соответственно (таблица 2, 3).

Таблица 2 – Характеристика хозяйственных и морфологических признаков черемухи обыкновенной – *Padus avium* Mill. на территории Алтайского ботанического сада

Форма		Длина кисти, см	Количество плодов в кисти, шт.	Размер плодов, мм		Масса плодов, г
				Длина	Диаметр	
АБС						
АБС - 1-15	(M±m)	9,9±0,7	10,8±1,1	7,6	7,4	0,34±0,01
	C%	15,20	21,9			4,7
	P%	1,72	2,60			4,5
АБС - 2-15	(M±m)	9,8±0,5	4,0±0,6	7,7	7,5	0,38±0,01
	C%	10,41	31,42			6,9
	P%	1,10	1,51			5,0
АБС - 3-15	(M±m)	10,3±0,4	10,0±0,9	7,8	7,5	0,42±0,02
	C%	7,93	19,21			9,1
	P%	0,91	2,22			5,2
АБС - 4-15	(M±m)	12,3±0,6	13,0±1,7	7,4	7,3	0,41±0,02
	C%	10,20	27,11			7,9
	P%	1,40	4,08			5,4
АБС - 5-15	(M±m)	9,0±0,5	11,0±2,2	7,5	7,4	0,35±0,01
	C%	12,72	17,04			6,8
	P%	1,27	2,19			4,5
АБС - 6-16	(M±m)	9,9±0,7	7,0±1,2	7,4	7,5	0,31±0,01
	C%	14,01	35,20			10,3
	P%	1,54	2,85			3,8
АБС - 7-16	(M±m)	11,7±0,6	9,0±1,5	7,5	7,4	0,31±0,01
	C%	10,30	29,84			9,6
	P%	2,57	7,50			4,8
АБС - 8-16	(M±m)	13,3±0,7	12,0±0,9	7,6	7,5	0,42±0,02
	C%	12,10	15,62			7,7
	P%	1,72	2,13			3,9

Таблица 3 – Характеристика хозяйственных и морфологических признаков черемухи обыкновенной – *Padus avium* Mill. хр. Ивановский, первый Кордон

Форма		Длина кисти, см	Количество плодов в кисти, шт.	Размер плодов, мм		Масса плодов, г
				Длина	Диаметр	
Корд-1-15	(M±m) C% P%	10,6±0,6 10,7 2,8	5,0±0,9 18,9 4,8	7,8	8,0	0,31±0,03 16,9 4,9
Корд-2-15	(M±m) C% P%	8,5±0,5 11,4 2,8	5,0±0,9 29,8 7,9	7,5	6,0	0,16±0,02 20,2 5,0
Корд-3-15	(M±m) C% P%	10,5±0,6 12,5 1,5	8,0±1,3 35,7 3,1	7,3	7,0	0,26±0,01 10,8 3,8
Корд-4-15	(M±m) C% P%	11,3±0,6 10,7 1,4	6,0±1,0 39,1 2,5	7,7	7,4	0,47±0,02 7,9 4,0
Корд-5-15	(M±m) C% P%	10,8±0,4 6,9 1,7	5,0±0,8 29,9 7,3	7,2	6,9	0,27±0,01 9,9 4,3
Корд-6-15	(M±m) C% P%	9,9±0,7 14,3 1,6	6,0±1,1 36,9 2,6	6,2	7,4	0,22±0,01 12,9 5,1

Продолжение таблицы

Форма		Длина кисти, см	Количество плодов в кисти, шт.	Размер плодов, мм		Масса плодов, г
				Длина	Диаметр	
Корд-7-15	(M±m)	10,6±1,1	5,0±0,8	7,6	7,9	0,28±0,01
	C%	18,5	27,5			7,1
	P%	4,9	7,4			4,4
Корд-8-15	(M±m)	9,0±0,9	5,0±0,6	7,6	7,8	0,29±0,01
	C%	18,6	19,4			7,2
	P%	5,2	5,4			5,0

Средняя масса плодов на территории сада выше почти на 0,1 г, чем на Кордоне. Среднее значение по формам в саду 0,37 г, на Кордоне 0,28 г. Вариативность по формам в саду от 0,31 г у форм АБС-6-15 и АБС-7-15 до 0,42 г у формы АБС-4-15, на Кордоне от 0,16 г у формы Корд - 2 -15 до 0,47 г у Корд - 4-15. Описанным формам в этих местонахождениях присущи мелкие плоды с вяжущим, кислым вкусом. По длине кисти большинство форм имеет среднюю кисть, среднее значение по формам в саду – 10,8 см, на Кордоне – 10,2 см. По количеству плодов в кисти большинство форм в саду входят в группу со средним количеством плодов от 7,2 до 9,7 шт., а на Кордоне с малым количеством – 4,6 – 7,1 шт.

Изучение эндогенной изменчивости морфологических и хозяйственно-биологических признаков проводили в кроне одной особи. По длине кисти коэффициент вариации в саду равен 11,6%, на Кордоне 12,9% – уровень изменчивости низкий. После изучения среднего показателя признака и амплитуды его варьирования для отдельных особей, переходили к изучению индивидуальной изменчивости. При индивидуальной изменчивости изменение характеризует только отдельную особь. Индивидуальная изменчивость по длине кисти выше в саду, 14,3% против 10,1% на Кордоне. Уровень изменчивости средний и низкий. По количеству плодов в кисти коэффициент вариации в саду равен 24,7%, на Кордоне 29,7% – уровень изменчивости высокий (эндогенная изменчивость). Индивидуальная изменчивость по количеству плодов в кисти также выше в саду, 32,4% против 19,5%, уровень изменчивости высокий и средний. По массе плодов коэффициент вариации в саду равен 7,9%, на Кордоне 11,6% – уровень изменчивости низкий (эндогенная изменчивость). Индивидуальная изменчивость по массе плодов выше на Кордоне 34,0% против 11,6% в саду. Уровень изменчивости по этому признаку на Кордоне высокий,

в саду средний. Работы по изучению местного вида черемухи будут продолжены.

Заключение

В Алтайском ботаническом саду изучены эколого-биологические особенности у 32 сортов и форм черемухи. В результате чего получены данные о ее высокой адаптационной способности. Растения зимостойкие. Цветение отмечается во второй, третьей декадах мая, в это время часто наблюдаются возвратные заморозки, которые губительно влияют на репродуктивные органы.

Изучение сортов и форм черемухи в коллекции и в природе свидетельствуют о том, что современные сорта черемухи превосходят наши дикорастущие формы по урожайности, размеру и вкусу плодов, стабильности плодоношения. Оценка черемухи по комплексу хозяйственно-биологических и декоративных признаков показала полную возможность возделывания ее в нашем регионе. Для внедрения в приусадебные, коллективные сады и озеленение рекомендуются 15 сортов: Августина, Валенсия, Гранатовая гроздь, Памяти Саламатова, Мавра, Поздняя радость, Пурпурная свеча, Самоплодная и отборные формы 14-1-51, 14-2-34, 13-8-60, 14-1-62, 13-14-1, 14-3-31, 54-1-34. Для привлечения в коллекцию из природы представляют интерес четыре формы: АБС -1-15, АБС -3-15, АБС -4-15, Корд. - 4-15. Они отличаются крупноплодностью, длиной кисти и количеством плодов в ней.

Плоды черемухи нужно использовать в лечебном питании и пищевой промышленности, в связи с богатым биохимическим составом.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Статья написана в рамках НТП «Разработка научно-практических основ и инновационных подходов интродукции растений в природных

зонах Западного и Восточного Казахстана для рационального и эффективного использования» на 2021-2022 гг. при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Деревья и кустарники СССР / Под редакцией Соколова С.Я. – М.: Изд-во Академии Наук СССР, 1954. – 826 с.
- 2 Симагин В.С. Исходный материал и основные пути создания декоративных сортов черемухи для Сибири // Декоративное садоводство Сибири: проблемы и перспективы. – Барнаул: «Принт – Инфо», 2010. – С. 115–117.
- 3 Чепинога И.С. Перспективные декоративные формы черемухи // Интродукция редких и нетрадиционных растений. – Мичуринск, 2008. – С. 245–246.
- 4 Симагин В.С. Характеристика признаков плода сеянцев черемухи виргинской от внутривидовых и повторных скрещиваний с гибридами черемуха виргинская х черемуха кистевая // Интродукция редких и нетрадиционных растений. – Мичуринск, 2008. – С. 242–244.
- 5 Surburg H., Güntert M., Schwarze B. Volatile constituents of European bird cherry flowers (*Padus avium* Mill.) // Journal of Essential Oil Research. – 1990. – Т. 2. – №. 6. – С. 307–316.
- 6 Zagurskaya Y. V., Siromlya T. I. Comparative Analysis of the Elemental Chemical Composition of *Padus avium* Shoots from Anthropogenically Disturbed Ecotops // Lesnoy Zhurnal (Forestry Journal). – 2019.
- 7 Grygorieva O. et al. Estimation of phenolic compounds content and antioxidant activity of leaves extracts of some selected non-traditional plants // Potravinarstvo. – 2020. – Т. 14. – №. 1.
- 8 Локтева А.В. Полиморфизм черемухи кистевой на юге Западной Сибири как источник форм для интродукции и аналитической селекции: автореф. дисс. канд. биол. наук. – Новосибирск, 2009. – С. 16–24.
- 9 St. Pierre R.G. The Chokecherry. A Guide for Growers. Saskatoon, 1993. – P.30.
- 10 Саламатов М.Н. Черемуха – *Padus* Mill. // Дикорастущие и культивируемые в Сибири плодовые и ягодные растения. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1980. – С. 158–162.
- 11 Руш В.А., Лизунова В.В. Химический состав дикорастущих ягод Сибири // Продуктивность дикорастущих ягодников и их хозяйственное использование. – Киров: Наука, 1972. – С. 44–47.
- 12 Aleksandra Telichowska, Joanna Kobus-Cisowska and Piotr Szulc Phytopharmacological Possibilities of Bird Cherry *Prunus padus* L. and *Prunus serotina* L. Species and Their Bioactive Phytochemicals/ Nutrients 2020, 12, 1966;
- 13 Terzioğlu S., Coşkunçelebi K. A Contribution to the Flora of Turkey: *Padus avium* Mill. subsp. *petraea* (Tausch) Pawlowski ex Holub // Turkish Journal of Botany. – 2005. – Т. 29. – №. 3. – С. 251–253.
- 14 Sergunova E. V. et al. Some pharmacognostic studies of the bird cherry (*Padus avium* Mill.) and mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) fruits collected from Moscow (Russia) // Pharmacognosy Journal. – 2019. – Т. 11. – №. 5. – С. 996–1002.
- 15 Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел: Управление издательств полиграфии и книжной торговли, 1999. – 420 с.
- 16 Селекция и сортоведение плодовых и ягодных культур. Под редакцией Татаринцева А.С. – М.: «Колос», 1981. – 366 с.
- 17 Ирошникова А.И., Мамаев С.А., Правдин Л.Ф., Щербаков М.А. Методика изучения внутривидовой изменчивости древесных пород // Центральный НИИ Лесной генетики и селекции. – М.: «Колос», 1973. – 31 с.
- 18 Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 412 с.
- 19 Бондарцев А.С. Шкала цветов (пособие для биологов при научных и научно-прикладных исследованиях) // – М. –Л.: АН СССР, 1954. – 28 с.
- 20 Вдовина Т.А., Иманбаева А.А., Лагус О.А., Данилова А.Н. Сорта и формы черемухи *Padus* Hill. для декоративного и потребительского садоводства // Методические рекомендации. – Риддер: «Медиа-Альянс», 2021. – 31 с.
- 21 Wawrzyniak M. K. et al. Oxidation processes related to seed storage and seedling growth of *Malus sylvestris*, *Prunus avium* and *Prunus padus* // PLoS one. – 2020. – Т. 15. – №. 6. – С. e0234510.
- 22 Kolyasnikova N. L. et al. Seed production capacity of *Padus avium* and *Padus maackii* in conditions of Perm and Chusovoy // Perm Agrarian Journal. – 2017. – Т. 20. – №. 4. – С. 14–17.
- 23 Rolbiecki S. et al. Water requirements of bird cherry (*Padus avium* Mill.) // Rocznik Ochrona Środowiska. – 2018. – Т. 20.
- 24 Passarge H. *Padus avium* ssp. *petraea* im nordherzynischen Bergland? // Feddes Repertorium. – 1987. – Т. 98. – №. 7–8. – С. 433–440.
- 25 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 13. – P. 473–497
- 26 Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. // Acta Hort. – 1977. – V.78. – P. 437–442.

References

- 1 Alexandra Telikhovskaya, Joanna Kobus-Cisowska and Peter Schultz Phytopharmacological possibilities of bird cherry species *Prunus padus* L. and *Prunus serotina* L. and their biologically active phytochemicals / *Nutrients* 2020, 12, 1966;
- 2 Bondartsev A.S. Color scale (a manual for biologists in scientific and applied research) – M. –L.: AS the USSR, 1954. – 28с.
- 3 Chepinoga I.S. Perspective decorative forms of bird cherry // *Introduction of rare and unconventional plants – Michurinsk*, 2008. – pp. 245-246.
- 4 Dospekhov B.A. Methodology of field experience. – M.: Kolos, 1979. – 412 p.
- 5 Grigorieva O. et al. Evaluation of the content of phenolic compounds and antioxidant activity of leaf extracts of some selected non-traditional plants // *Potravinarstvo*. – 2020. – Vol. 14. – No. 1.
- 6 Iroshnikova A.I., Mamaev S.A., Pravdin L.F., Shcherbakov M.A. Methodology for studying intraspecific variability of tree species// *Central Research Institute of Forest Genetics and Breeding*. – M.: «Kolos», 1973. – 31 p.
- 7 Kolyasnikova N. L. et al. Seed productivity of *Padus avium* and *Padus maackii* in Perm and Chusovaya // *Perm Agrarian Journal*. – 2017. - № 20. – № 4. – pp. 14-17.
- 8 Kuoirin M., Lepuav P. Improved medium for cultivation of *Prunus* sp. in vitro // *Acta Hort.* – 1977. – V.78. – pp. 437-442.
- 9 Lokteva A.V. Polymorphism of brush cherry in the south of Western Siberia as a source of forms for introduction and analytical selection: abstract. diss. cand. biol. sciences. – Novosibirsk, 2009. – pp. 16-24.
- 10 Murashige T., Skug F. Revised medium for rapid growth and bioanalysis with tobacco tissue cultures// *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, No. 13. – pp. 473-497
- 11 Passarge H. *Padus avium* ssp. *petraea* im nordherzynischen Bergland? // *Feddes Repertorium*. – 1987. – p. 98. - No. 7-8. – p. 433-440.
- 12 Program and methodology of variety study of fruit, berry and nut crops. – Orel: Department of Publishing houses of printing and book trade, 1999. – 420 p.
- 13 Rolbecki S. et al. The need of bird cherry in water (*Padus avium* Mill.) // *Rocznik Ochrona Srodowiska*. – 2018. - Vol. 20.
- 14 Rush V.A., Lizunova V.V. Chemical composition of wild berries of Siberia // *Productivity of wild berries and their economic use*. – Kirov: Nauka, 1972. – pp. 44-47.
- 15 Saint-Pierre R.G. Chokeberry. Manufacturers' Guide. Saskatoon, 1993. – p.30.
- 16 Salamatov M.N. Cheremukha - The *Padus* Mill.// *Wild and cultivated fruit and berry plants in Siberia*. – Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch, 1980. – pp. 158-162.
- 17 Selection and varietal studies of fruit and berry crops. Edited by Tatarintseva A.S. – M.: «Kolos», 1981. – 366 p.
- 18 Sergunova E. V. et al. Some pharmacognostic studies of cherry (*Padus avium* Mill.) and rowan (*Sorbus aucuparia* L.) fruits collected in Moscow (Russia) // *Journal of Pharmacognosy*. – 2019. – № 11. – № 5. – Pp. 996-1002.
- 19 Simagin V.S. Characteristics of fruit characteristics of seedlings of virgin cherry from intraspecific and repeated crosses with hybrids of virgin cherry x brush cherry // *Introduction of rare and unconventional plants – Michurinsk*, 2008. – pp. 242-244.
- 20 Simagin V.S. The source material and the main ways of creating decorative varieties of bird cherry for Siberia // *Decorative gardening of Siberia: problems and prospects*, Barnaul: «Print – Info», 2010. – pp.115-117.
- 21 Surburg H., Guntert M., Schwarze B. Volatile components of flowers of European cherry (*Padus avium* Mill.) // *Journal of research of essential oils*. – 1990. - № 2. – № 6. – pp. 307-316.
- 22 Terzioğlu S., Koshkunchelbi K. Contribution to the flora of Turkey: *Padus avium* mill. subsp. *petraea* (Tausch) Pawlowski ex Holub // *Turkish Botanical Journal*. – 2005. – vol. 29. – No. 3. – pp. 251-253.
- 23 Trees and shrubs of the USSR / Edited by Sokolov S.Ya. – Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, 1954. - 826 p.
- 24 Vavzhinyak M. K. et al. Oxidative processes associated with seed storage and seedling growth of *Malus sylvestris*, *Prunus avium* and *Prunus padus* // *PloS one*. – 2020. – Vol. 15. - No. 6. – p. e0234510.
- 25 Vdovina T.A., Imanbayeva A.A., O Lagus.A., Danilova A.N. Varieties and forms of cherry cherry-Hill. for decorative and consumer gardening // *Methodological recommendations*. – Ridder: Media Alliance, 2021. – 31с.
- 26 Zagurskaya Yu. V., Siromlya Yu. I. Comparative analysis of the elemental chemical composition of *Padus avium* shoots from anthropogenically disturbed ecotopes // *Lesnoy zhurnal*. – 2019.

2-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 2
BIOTECHNOLOGY

Раздел 2
БИОТЕХНОЛОГИЯ

А.А. Жұбанова , Г.Ж. Абдиева , П.С. Уалиева , А.М. Мәлік* 

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

СҮТ САРЫСУЫНЫҢ МИКРОБТЫҚ ҚАУЫМДАСТЫҒЫНЫҢ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕРІ ЖӘНЕ ТАКСОНОМИЯЛЫҚ ҚҰРАМЫН ЗЕРТТЕУ

Биоэтанолға деген қызығушылық соңғы онжылдықтарда айтарлықтай артты, ол тек еріткіш, антифриз немесе әртүрлі органикалық қосылыстардың кең спектрін өндіруге арналған шикізат ретінде ғана емес, сонымен қатар белгілі бір дәрежеде өтеуге болатын биоотын ретінде де қарастырылды. Биоэтанолдың бензинге қарағанда келесі артықшылықтары бар: ол атмосфераны аз ластайды, оңай ыдырайды, октан саны жоғары және оны өндіру үшін жаңартылатын шикізатты пайдалана алады. Биоэтанолға үнемі өсіп келе жатқан сұраныс астық немесе картопқа қарағанда арзан жаңа субстраттарды іздеуді талап етеді. Осындай субстраттардың бірі ретінде негізгі көмірсуы лактоза болып табылатын сүт сарысуын пайдалану ұсынылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты: сүт сарысуының микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері және таксономиялық құрамын зерттеу.

Зерттеу жұмысы барысында «Мерке ірімшік зауыты» ЖШС, «Амиран» (сүт сарысуы) ЖШС, «Стелла Альпина» ЖШС (ірімшік сарысуы) сүт сарысуларының микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері және таксономиялық құрамы зерттелді. Сүт сарысу үлгілерінен ашытқылардың 3 штаммы және сүт қышқылды бактериялардың 1 штамы бөлініп алынды. Ашытқылар мен сүт қышқылы бактерияларының дақылдарын түрге дейін идентификациялау нәтижесінде ГБ және ГТ штамдары *Kluyveromyces marxianus* түріне, М1 штамы – *Lactococcus lactis*, А1 – *Candida inconspicua* түріне дейін идентификацияланды.

Түйін сөздер: сүт сарысуы, биоэтанол, ашытқы дақылдары, сүтқышқылды бактериялар, штамм.

A.A. Zhubanova, G.Zh. Abdieva, P.S. Ualieva, A.M. Malik*

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

Study of microbiological indicators and taxonomical composition of microbial association of milk whey

Interest in bioethanol has grown significantly in recent decades, not only as a solvent, antifreeze or feedstock for the production of a wide range of different organic compounds, but also, to some extent, as a biofuel. Bioethanol has the following advantages over gasoline: it is less polluting, decomposes easily, has a high octane number, and can use renewable raw materials for its production. The ever-growing demand for bioethanol requires the search for new substrates that are cheaper than grain or potatoes. As one of these substrates, it is recommended to use whey, the main carbohydrate of which is lactose.

The purpose of the study: to study the microbiological indicators and taxonomic composition of the microbial community of whey.

In the course of the study, the microbiological indicators and taxonomic composition of the microbial community of whey of Merke Cheese Factory LLP, Amiran LLP (whey), Stella Alpina LLP (cheese whey) were studied. From the serum samples, 3 strains of yeast and 1 strain of lactic acid bacteria were isolated. As a result of prespecies identification of cultures of yeasts and lactic acid bacteria, strains of GB and GT were identified as *Kluyveromyces marxianus*, strain M1 – *Lactococcus lactis*, A1 – *Candida inconspicua*.

Key words: whey, bioethanol, yeast cultures, lactic acid bacteria, strain.

А.А. Жұбанова, Г.Ж. Абдиева, П.С. Уалиева, А.М. Мәлік*
Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

**Изучение микробиологических показателей
и таксономического состава микробной ассоциации
молочной сыворотки**

Интерес к биоэтанолю значительно вырос в последние десятилетия не только как к растворителю, антифризу или сырью для производства широкого спектра различных органических соединений, но и в некоторой степени как к биотопливу. Биоэтанол имеет следующие преимущества перед бензином: он меньше загрязняет атмосферу, легко разлагается, имеет высокое октановое число и может использоваться для своего производства как возобновляемое сырье. Постоянно растущий спрос на биоэтанол требует поиска новых субстратов, более дешевых, чем зерно или картофель. В качестве одного из таких субстратов рекомендуется использовать молочную сыворотку, основным углеводом которой является лактоза.

Цель исследования – изучить микробиологические показатели и таксономический состав микробного сообщества молочной сыворотки.

В ходе исследования изучены микробиологические показатели и таксономический состав микробного сообщества молочной сыворотки ТОО «Сырзавод «Мерке», ТОО «Амиран» (сыворотка), ТОО «Стелла Альпина» (сырная сыворотка). Из образцов сыворотки выделено 3 штамма дрожжей и 1 штамм молочнокислых бактерий. В результате предварительной идентификации культур дрожжей и молочнокислых бактерий штаммы ГБ и ГТ идентифицированы как *Kluyveromyces marxianus*, штамм М1 – *Lactococcus lactis*, А1 – *Candida inconspicua*.

Ключевые слова: сыворотка, биоэтанол, дрожжевые культуры, молочнокислые бактерии, штамм.

Кіріспе

Соңғы бірнеше жылда мұнай мен газ бағасының күрт өсуіне, сондай-ақ бірқатар экологиялық проблемаларға байланысты биоөңделетін шикізатты пайдалануға негізделген биоэтанол өндірісін тұтынудың жылдам артуы дүние жүзінде атап өтілді [1-3]. Қазіргі таңда биоэтанолдың 90%-дан астамы, әдетте, катализаторлар ретінде ашытқы клеткаларын (көбінесе *Saccharomyces cerevisiae*) пайдалана отырып өндіріледі [4].

Крахмалды мақсатты өнімге – этанолға айналдыра отырып, амилолитикалық ферменттердің көмегімен крахмалды глюкозаға ферментативті түрлендіру арқылы биоэтанол алу үшін қолданылатын құрамында крахмалы бар шикізаттан басқа, биотехнологиялық өндірістің тағы бір перспективті көзі бар, ол – сүт сарысуы.

Тамақ өнеркәсібі және қайта өңдеу өнеркәсібі, халық шаруашылығының көптеген басқа салалары сияқты, қоршаған ортаны ластау көзі болып табылады. Сүт өнеркәсібі үшін сүт шикізаттың негізгі көзі болып табылады, бірақ оны қайта өңдеу кезінде сарысу, майсыздандырылған сүт, айран, сепаратор шламы және т.б. сияқты екіншілік шикізат пен қалдықтар пайда болады. Олар ағынды суларды ластаудың негізгі көзі болып табылады. Қалдық өндірістің барлық

дерлік кезеңдерінде түзілетіндіктен, барлық процестер әртүрлі ластаушы заттардың түзілуіне ықпал етеді [5]. Ластану құрамы бойынша сүт өнеркәсібінің ағынды сулары тұрмыстық сарқынды суларға қарағанда 10 есе көп ластанған және тазартылмай ағызылғанда қоршаған ортаға ерекше қауіп төндіреді. Су қоймаларына ағызылған кезде тазартылмаған ағынды сулар судың физика-химиялық қасиеттерін айтарлықтай нашарлатады, ондағы оттегінің құрамын төмендетеді. Белгілі бір концентрацияларда ағынды сулардың ашық суқоймаларына түсіуі судағы биологиялық ресурстарының тіршілігіне кері әсерін тигізеді. Тағам және басқа да өнеркәсіп орындарының көпшілігі елді мекендер аумағында орналасқандықтан, олардың сарқынды сулары тек канализация жүйесіне ғана емес, сонымен қатар су құбырларына да бітетіндігі проблеманы қиындатады.

Тазалау құрылыстарының құнын төмендетудің және су айдындарына сарысуды төгуден келетін зиянды жоюдың бірден-бір жолы – оны ұтымды пайдалану. Бұл өте қажет, өйткені сүттің құрғақ бөліктерінің жартысы сүт сарысуына өтеді, нәтижесінде сүтті өңдеу кезінде шамамен 15 тонна сарысуды қабылдап, оны ағынды суларға жіберетін зауыт 45 кг май, 120 кг ақуыз, 720 кг сүт қанты, сондай-ақ витаминдер мен минералдардың айтарлықтай

мөлшерін жоғалтады. Сүт сарысуын өңдеудің әртүрлі әдістері бар, олар одан ең құнды ингредиенттерді бөліп алумен немесе оның барлық компоненттерін пайдаланумен байланысты болуы мүмкін. Бұл микробтық синтез өнімдерін алу үшін ақуызды, сүт қантын алу, глюкоза-галактоза сиропын, әртүрлі сусындарды дайындау, микроорганизмдерді өсіру үшін орта ретінде пайдалану [6]. Дегенмен, барлық нұсқалардың ішінде спирт алу үшін сарысуды лактозаны ашытатын ашытқылардың әртүрлі культураларымен ашыту бүгінгі күні өте өзекті болып қала береді және зерттеушілер үшін үлкен қызығушылық тудырады.

Этил спирті (этанол) – көмірсуларды микроорганизмдердің ашыту процесінің кең таралған өнімдерінің бірі болып табылады. Этанол синтетикалық каучук өндіру үшін еріткіш және химиялық шикізат ретінде, медицинада, сонымен қатар бензинді ішінара алмастыра алатын отын ретінде (оны 10% және одан да көп концентрацияда бензинге қосуға болады) кеңінен қолданылатыны белгілі [7].

Спирт өндірісінің дәстүрлі шикізаты – құрамында жеткілікті ашытылатын қанттар немесе қанттандыруға болатын басқа көмірсулар бар әртүрлі өсімдік материалдары. Құрамында крахмал бар материалдардың ең көп қолданылатыны астық (қара бидай, бидай, жүгері, арпа, сұлы, тары) және картоп, құрамында қант бар материалдар – меласса (қант және крахмал өндірісінің қалдықтары), дефектті қант қызылшасы, сонымен қатар ағаш қалдықтары және ауылшаруашылық қалдықтары.

Микроорганизмдер ұзақ уақыт бойы спирт және спирттік сусындарды өндіру үшін қолданылған. Мәселен, Шығыста *Aspergillus oryzae* [8] дақпылы күріш арағын (сакэ) өндіруде спирттік ашыту қоздырғышы ретінде қолданылады, Мексикада және басқа елдерде осындай жағдайларда *Zygomonas mobilis* [9] бактериялары қолданылады. Бірақ, әртүрлі шараптарды, сыраны, арақтарды және басқа да алкогольді және аз алкогольді сусындарды өндіруде ең үлкен практикалық маңызы бар ашытқы, оның этанолының негізгі өндірушілері *Saccharomyces cerevisiae* штамдары болып табылады [10, 11]. Олар, басқа саңырауқұлақтардың көпшілігі сияқты, аэробты тыныс алады, бірақ ауасыз, көмірсуларды этанол мен CO₂-ге дейін ашытады.

Этанолға үнемі өсіп келе жатқан сұраныс астық немесе картопқа қарағанда арзан жаңа

субстраттарды іздеуді талап етеді. Осындай субстраттардың бірі ретінде негізгі көмірсуы лактоза болып табылатын сүт сарысуын пайдалану ұсынылады. Соңғы 30 жылда көптеген авторлар негізінен *Kluyveromyces fragilis*, *K. marxianus* және *C. pseudotropicalis* ашытқыларына сілтеме жасай отырып, лактозадан этанол алу тәсілдерін қарастырды. «The Yeasts, a taxonomic study» деген зерттеудің ең соңғы басылымында [12] олардың барлығы *K. marxianus* ашытқысының синонимдері ретінде берілген. *K. fragilis* және *K. marxianus* ашытқылары ежелден жеке түр болып саналды, бірақ бүгінде *K. fragilis* ашытқысы *K. marxianus* түрінің құрамына кіреді. *Candida pseudotropicalis* (*C. kefir* синонимі) — *K. marxianus* анаморфты (жыныссыз) түрі. Ғылыми зерттеулерден басқа, негізінен *Kluyveromyces* ашытқысын пайдаланып, сарысудан этанол өндіретін өнеркәсіптік зауыттардың бірнеше жағдайлары бар [13-14]. *S. cerevisiae* ашытқысын лактозаны ашыту үшін қолдануға да көп көңіл бөлінді. Бастапқы стратегиялар алдын ала гидролизденген лактоза ерітінділерін, яғни глюкоза мен галактоза қоспаларын ашытуды қамтыды. Сонымен қатар, лактоза-фертильді *S. cerevisiae* штамдары протопласт синтезі және гетерологиялық β-галактозидазалардың экспрессиясы сияқты бірнеше әдістермен жасалған [15-17].

Соңғы жиырма жылда биокатализаторлардың жаңа түрін – микроорганизмдердің иммобилизацияланған клеткаларын алу бойынша зерттеулер белсенді түрде жүргізілуде [18-21]. Олар микроорганизмдердің иммобилизацияланған клеткаларының негізінде сарысу негізінде этанолдың экономикалық тиімді өндірісін ұйымдастыруға болатынын көрсетеді. Бұл субстраттың құны өте төмен, ал иммобилизацияланған микроб клеткаларына негізделген биореактордың өнімділігі әртүрлі авторлардың пікірінше, бос клеткаларға негізделген дәстүрлі биореакторға қарағанда 3-50 есе жоғары. Көптеген жарияланымдар гидрофилді гельдерге енгізілген ашытқы клеткалары бар биореакторларды сипаттайды; сорбция және химиялық иммобилизация туралы есептер бар [22].

Осылайша, жоғарыда келтірілген мысалдарда көрсетілгендей, иммобилизацияланған ашытқы клеткалары бар биореактор биоэтанолдың жоғары шығымдылығымен оңтайлы жағдайларда сарысуды үздіксіз ферментациялауға мүмкіндік береді.

Зерттеу әдістері

Сарысу үлгілерінің физика-химиялық көрсеткіштерін және микробтық пейзаждарын зерттеу. Сүт сарысуынан сынама алу және олардың физика-химиялық және органолептикалық қасиеттерін зерттеу.

Сүт сарысуын іріктеу процесінде түзілетін ағынды сулардан сынамаларды алу (ГОСТ 33957-2016 «Сүт сарысуы және оның негізіндегі сусындар. Қабылдау ережелері, сынамаларды іріктеу және бақылау әдістері»).

Органолептикалық көрсеткіштерді анықтау.

Органолептикалық бағалау сынама алынғаннан кейін де, 2°C-тан 6°C-қа дейінгі температурада 8 сағаттан аспайтын сақтау және тасымалдаудан кейін де жүргізіледі.

Дәмі мен иісі, құрылымы, сыртқы түрі мен түсі визуалды және сенсорлық талдау арқылы анықталады және олардың стандартты қабылдаған елдегі қолданыстағы нормативтік немесе техникалық құжаттарға сәйкестігін тексереді.

Өнімдердің сыртқы түрі мен түсі келесідей анықталады. Біріктірілген үлгіден сарысудың немесе сусынның бір бөлігі таза және құрғақ Петри табақшасына құйылады, оны ыдыстың жартысына жуығына толтырады. Петри табақшасын ақ қағазға қойып, шағылысқан жарықта ыдыстың ішіндегісін зерттейді.

Иісі мен дәмін органолептикалық бағалау өнімді иіскеу және дәмдеу арқылы жүзеге асырылады. Өнімнің сынақ үлгісі бар стақан мұрынға 1-2 см қашықтықта жеткізіледі. Иісі қысқа терең екі рет тыныс алу арқылы анықталады. Содан кейін, өнімді кем дегенде 10 см ішеді, оны ауыз қуысына тілдің түбіне дейін жеткізіп және оны ауыз қуысында шамамен 7 секунд ұстайды. Содан кейін үлгі түкіргішке төгіледі. Жұту қозғалысы мұрынға дем шығару арқылы жүзеге асырылады және сынақ үлгісінің иісі мен дәміне қорытынды баға беріледі. Ауыз қуысы 35 ± 5°C температурада әлсіз қайнатылған шаймен мұқият шайылады.

Сарысу мен сусындардың консистенциясы оларды сыйымдылығы шамамен 100 см³ мөлдір түссіз колбадан құйылатын сұйықтықтың біртектілігін бақылай отырып, сол текті басқа колбаға құю арқылы анықталады. Содан кейін олар өнімдер құйылған ыдыстың ішкі қабырғаларын мұқият тексеріп, ақуыз үлпектерінің болуын және т.б.

Титрленетін қышқылдықты анықтау.

Титрленетін қышқылдықты анықтау сүт сарысуындағы тұздарды, белоктарды, көмір-

қышқыл газын және басқа қосылыстарды натрий гидроксидімен титрлеуге негізделген. Бастапқы сынақтардағы титрленетін қышқылдық Тернер градусымен (°Т) көрсетілген. Титрленетін қышқылдықты анықтау үшін сыйымдылығы 150 см³ конустық колбада үш тамшы 1% фенолфталейн ерітіндісі бар 10 см³ сарысуды өлшеу керек. Ерітіндіні мұқият араластырып, 0,1 Н титрлейді, мысалы, натрий (калий) гидроксиді, тұрақты қызғылт түс алынғанша. Бұл титрлеу процесі үш рет қайталанып, қышқылдықты анықтау үшін ортаңғы нүкте пайдаланылды. Қышқылдықты есептеу формуласы (2.1).

$$X = \frac{n \times 100}{m} \quad (2.1)$$

Бұл формулада: X – қышқылдық өлшемі; n – титрлеуге жұмсалған 0,1 н NaOH көлемі, см³; 100 – 100 г өнімге түрлендіруге қажетті коэффициент; m – сарысудың массасы, г.

Белсенді қышқылдық – сарысудың рН мәндері зертханалық рН-метр – 150 МІ көмегімен анықталды. рН өлшеу процесі әр 3 күн сайын қайталанады. Сарысу қышқылдығы РН оны орта ретінде пайдалану критерийлерінің бірі болып табылады.

Сарысудың микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштерін және таксономиялық құрамын зерттеу.

Микроорганизмдердің физиологиялық топтарын және санын анықтау қатты қоректік орталарда табиғи субстрат үлгілерін сұйылту әдісімен жүзеге асырылды. Үлгілердегі микроорганизмдердің колония түзуші бірліктерінің титрін анықтауда Кох әдісі қолданылды. Әдістің мәні зерттелген микроорганизмдердің суспензиясының белгілі бір көлемін Петри табақшаларына қатты ортаға егу және инкубациядан кейін өсіп шыққан колонияларды санау болып табылады. Егу Петри табақшаларында агар қоректік ортада жүргізіледі. Инокуляцияларды инкубациялаудан кейін өсірілген колониялардың саны анықталды және 1 г үлгідегі колония түзуші бірліктердің (КТБ) саны анықталды. Табиғи субстраттардың микрофлорасының сапалық және сандық құрамын зерттеу микробиологияның дәстүрлі әдістерімен жүргізілді. МАФАНМ микроорганизмдерінің жалпы санын анықтау үшін ет-пептонды агар (МПА) қолданылады. Микроорганизмдердің әртүрлі физиологиялық топтарының санын анықтау үшін элективті сәйкес қоректік орталарды пайдаланады. Ашытқыны бөліп алу үшін үшін қатты және сұйық Сабуро, МРС, МПА орта-

лары қолданылды. Дақылдарды өсіру термостатта 28°C-30°C температурада 2-5 күн бойы жүргізілді. Ашытқыларды өсіру үшін қоректік орта ретінде Сабуро ортасы (ашытқы үшін), (г/л): глюкоза-40,0; пептон-10,0; агар 18,0-20,0 құбыр суы.

Сарысу үлгілерінен таза дақылдарды бөліп алу әдістері

Таза дақылдарды бөліп алу тығыз қоректік ортаның бетінде механикалық бөлу арқылы жүзеге асырылды (тұзақты күйдірумен штрих әдісі) [23]. Жеке колониялардың тазалығы микроскопия арқылы тексерілді және өсіру үшін қоректік агар қиғаштарына жабылды. Микроорганизмдердің таза дақылдары 2-5 күн бойы культивацияланды.

Микроорганизмдердің морфология – дақылдық, физиология – биохимиялық сипаттамаларын анықтау жалпы қабылданған әдістер бойынша жүргізілді. Ашытқылардың морфологиялық және дақылдық қасиеттері келесі белгілер бойынша зерттелді: клеткалардың пішіні мен орналасуы, клетка өлшемі, қатты қоректік ортадағы колония сипаттамасы, сұйық қоректік ортада өсу сипаты. Ашытқылардың физиологиялық және биохимиялық қасиеттері келесі белгілер бойынша анықталды: ашытқылардың 200C, 28°C, 37°C, 45°C температурадағы термиялық тұрақтылығы, 2%, 4% және 6% NaCl әртүрлі концентрацияларға төзімділігі, әртүрлі көмірсуларды ашытуы [24].

Ашытқы дақылдары морфология-дақылдық, физиология-биохимиялық қасиеттерін зерттеу негізінде дәстүрлі әдістермен анықталды. Ашытқыларды анықтау үшін анықтамалық нұсқаулықты И.П. Бабиева, В.И. Голубева «Ашытқыларды бөліп алу және идентификациялау әдістері» қолданды [25].

Ашытқылардың әрбір түріне қатысты эксперименттер 3 рет қайталаумен жүргізілді.

Лактозаны ашытатын перспективті ашытқы штамдарын бөліп алу және анықтау.

Геномдық ДНҚ өндірушінің (Invitrogen, Carlsbad, АҚШ) хаттамасына сәйкес ДНҚ оқшаулау үшін PureLink геномдық ДНҚ жинағының көмегімен бактериялардың күнделікті дақылдарынан бөлініп алынды. Үлгілердегі ДНҚ концентрациясы Qubit™ dsDNA HS талдау жинағы (Life Technologies, Орегон, АҚШ) көмегімен Qubit® 2.0 флюорометрде анықталды. Генетикалық маркер ретінде 16S рРНҚ генінің аймағы пайдаланылды. 16S РНҚ

аймағын амплификациялау үшін 25 мкл реакция қоспасы дайындалды: 12,5 мкл Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs Ins., АҚШ); әмбебап праймер жұбы: 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') және 806R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') [Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M., Velasco E., Ruiz J., Vila J. Outbreak of infection with *Acinetobacter* strain RUH 1139 in an intensive care unit // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. – 2006. – Vol. 27. – P. 397-404.] 10 мкМ концентрацияда 1,2 мкл; ДНҚ матрицасы және су 25 мкл дейін. Қолдану режимі келесі циклдардан тұрды: 95°C 5 минут, содан кейін: 95°C – 30 секунд, 55°C – 40 секунд, 72°C – 50 сек – 30 цикл; ұзарту 72°C температурада 10 минут.

ПТР өнімі CleanSweep™ ПТР тазарту реагентінің көмегімен тазартылды (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Бактериялардың 16S rRNA генінің фрагменттерін секвенирлеу өндірушінің хаттамасына (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems, АҚШ) сәйкес Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, АҚШ) арқылы жүзеге асырылды, содан кейін фрагменттерді автоматты генетикалық анализатор 3500 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Токио Жапония) ішіне бөлу жүзеге асырылды.

Тізбектеу нәтижелері SeqA бағдарламалық құралының (Қолданбалы биосистема) көмегімен өңделді. 16S рРНҚ гендерінің гомологты нуклеотидтер тізбегін іздеу АҚШ Ұлттық биотехнологиялық ақпарат орталығының Халықаралық гендік банкінің дерекқорындағы BLAST бағдарламасының (Негізгі жергілікті теңестіруді іздеу құралы) көмегімен жүзеге асырылды (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, 1997. Vol. 25, No. P. 3389-3402]. Филогенетикалық талдау MEGA 6 бағдарламалық құралын [Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*. Vol. 5 No 2. 150-163. June, 2004. [PubMed]. Нуклеотидтер тізбегін тупалау ClustalW алгоритмі арқылы орындалды. Филогенетикалық көршілер BLASTN Neighbor-Joining (NJ) Altschul әдісі арқылы анықталды.

Нәтижелер және талқылау

Сүт сарысуының физика-химиялық және органолептикалық қасиеттері

Сүт сарысуы – ірімшік, сүзбе, казеин өндірісіндегі қосымша өнім. Сүт сарысуының құрамы айтарлықтай өзгереді және ол өндірілген ірімшік түрінен сарысу және оның майлылығы; сүзбе үшін – сүзбе өндіру әдісінен және оның майлылығынан; казеин – өндірілген казеин түрімен тығыз байланысты болады. Майлы ірімшіктерді өндіруде негізінен казеин және сүт майы тұтынылады, және қалған компоненттер айтарлықтай мөлшерде сүт сарысуына өтеді.

Екінші сүт шикізатының химиялық құрамы, энергетикалық немесе тағамдық құндылығы және физикалық қасиеттері көбінесе оны өндіру әдістеріне байланысты. Қазіргі уақытта сүтте кездесетін барлық дерлік қосылыстар белгілі бір дәрежеде екіншілік сүт шикізатына өтеді [26].

Біз өз жұмысымызда сүт сарысуының физика-химиялық және органолептикалық қасиеттерін зерттедік. Зерттеу нысаны ретінде «Меркен ірімшік зауыты» ЖШС сүт сарысуын, «Amiran» ЖШС (сүт сарысуы), «Stella Alpina» ЖШС (ірімшік сарысуы) пайдаландық. Сарысу үлгілерінің органолептикалық көрсеткіштері кесте-1 берілген.

1-кесте – Сүт сарысуының органолептикалық сипаттамасы

Аты	Сарысу		
	ТОО Amiran (сүт сарысуы)	ТОО Stella Alpina (ірімшік сарысуы)	ТОО «Мерке ірімшік зауыты»
Иісі және дәмі	бөгде дәмсіз және иіссіз таза сүт дәмі	тұзды дәм, ірімшік иісі	таза сүт дәмі мен сүтті иіс
Сыртқы түрі және консистенциясы	тұнбасыз және қабыршақсыз біртекті мөлдір сұйықтық	тұнбасыз біртекті мөлдір сұйықтық	тұнбасыз және қабыршақсыз біртекті мөлдір сұйықтық
Түсі	ақшыл	сарғыш немесе бозғылт жасыл	сары

Сүт сарысуының органолептикалық қасиеттерін зерттеу нәтижесінде «Мерке ірімшік зауыты» ЖШС және «Amiran» ЖШС сүт сарысуы таза сүт дәмі мен сүт иісі бар, консистенциясы тұнбасыз біртекті мөлдір емес сұйықтық, түсі ақтан ашық сарыға дейін болды. «Stella Alpina» ЖШС сүт сарысуы тұзды дәмі, ірімшік иісі бар, консистенциясы біркелкі, тұнбасыз және үлпексіз мөлдір сұйықтық, түсі сарғыш немесе бозғылт жасыл. Нәтижелер таңдалған сүт және

ірімшік сарысуын өндірушілердің өнімдерінің жақсы сапасын көрсетеді және пайдаланылған сарысудың жақсы сапасын көрсетеді. Сарысуға сәйкес келетін консистенциясы мен қалыпты сыртқы түрі, дәмі мен иісі біркелкі болуы сарысуды жинау кезеңінде барлық санитарлық нормалар мен ережелердің сақталуын куәландырады.

Өрі қарай жұмыста сүт сарысуы үлгілерінің физика-химиялық көрсеткіштері зерттелді. Нәтижелер 2-кестеде көрсетілген.

2-кесте – Сүт сарысуының физика-химиялық көрсеткіштері

Сарысу	Көрсеткіштер			
	Май %	Ақуыз %	Көмірсу %	Энергетикалық құндылығы, ккал/г
Amiran (сүзбе сарысуы)	0.2 ± 0,008	0,8 ± 0,032	3,2 ± 0,13	20 ± 0,8
Stella Alpina (ірімшік сарысуы)	0.2 ± 0,008	0,8 ± 0,032	3,5 ± 0,14	20 ± 0,8
«Меркен ірімшік сарысуы»	0.2 ± 0,008	0,8 ± 0,032	3,2 ± 0,13	20 ± 0,8

Сарысудың құрғақ затын құрайтын компоненттер олардың тағамдық және технологиялық қасиеттерін анықтайды. Екінші реттік сүт

шикізатының ең бағалы компоненттері – белоктар, сүт майлары, көмірсулар, минералды тұздар. 2-кестеге сәйкес барлық сарысу

үлгілерінде: майлар – 0,2%, белоктар – 0,8%, көмірсулар 3,2-3,5% аралығында, энергетикалық құндылығы 20 ккал/г құрады.

Сүт сарысуының әртүрлі түрлерінің құрамы мен қасиеттері алынған негізгі өнімнің түріне байланысты. Сарысудың құрамындағы негізгі компонент лактоза болып табылады, ол құрғақ затта 70-75% құрайды. Сонымен қатар, сүзбе сарысуындағы лактоза сүт қышқылына ашытуға байланысты сәл аз болады, бұл сарысудың қышқылдығына әсер етеді. Сүттің жеке компоненттерінің сүт сарысуына өту дәрежесі гелдену және синерезис процестерімен байланысты. Майдың 6,3 – 12,4%-ы сарысуға өтеді, ал оның абсолютті мөлшері шикізат пен технологияның майлылығына байланысты кең шектерде – 0,05-0,5%-ға дейін өзгереді. [27].

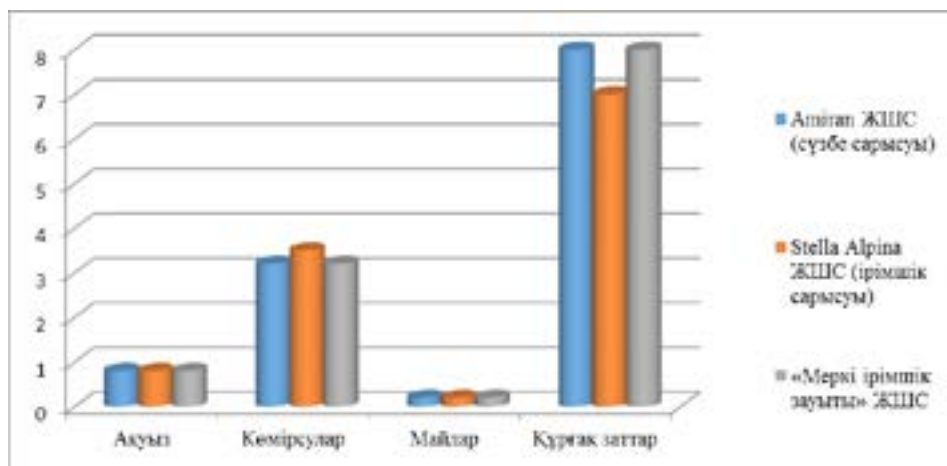
Әрі қарай жұмыста біз құрғақ заттың массасын және сарысу үлгілерінің ылғалдылығын анықтадық (Кесте-3). Ылғалдылық МАС 110.X Radwag ылғал анализаторы арқылы анықталды. Сүт өнімдері (сүт, сарысу) 110 градус Цельсийде өлшенеді, өнімнің көлемі 5 мл. Құрғақ заттың

массасы үлгі толық құрғағанша дәл осылай анықталды.

3-кесте – 100 г сүт сарысуындағы құрғақ заттың салмағы мен ылғалдылығы

Сарысу	Ылғалдылық %	Құрғақ зат (г)
Amiran ЖШС (сүзбе сарысуы)	92.067±1,8	8±0,16
Stella Alpina ЖШС (ірімшік сарысуы)	93.001±1,9	7±0,14
«Меркі ірімшік зауыты» ЖШС	92±1,8	8±0,16

Құрғақ затты анықтау шикізаттың сапасын бағалау кезінде ерекше маңызды және қажетті көрсеткіш болып табылады. 3 кестеден көріп отырғанымыздай, сарысу үлгілерінің ылғалдылығы 92-93,001% аралығында болды, 100 г сарысудағы құрғақ заттың массасы 7-8 г. Сарысу үлгілеріндегі негізгі компоненттердің құрамы 1 суретте көрсетілген.



1-сурет – Сүт сарысуы үлгілеріндегі негізгі компоненттердің құрамы

1-суреттен көрініп тұрғандай, сүт сарысуының әртүрлі түрлерінің құрамы мен қасиеттері шикізаттың осы түрлеріне арналған нормативтік-техникалық құжаттаманың талаптарына сәйкес келеді, бұл сүт сарысуының үлгілерін биоэтанол өндірісінде пайдалануға жарамды деп санауға толық құқық береді.

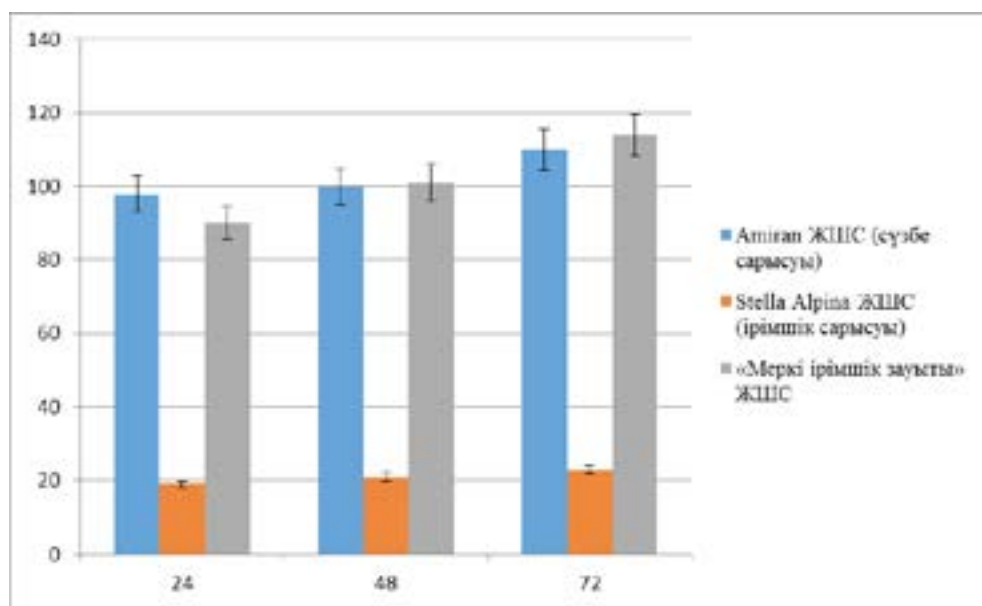
Сүт сарысуының титрленетін қышқылдылығын және белсенді қышқылдығын анықтау. Титрленетін қышқылдық сүт пен сүт өнімдерінің балғындығының ең маңызды көрсеткіші бо-

лып табылады. Жалпы қышқылдық деп титрлеу кезінде сілтімен әрекеттесетін өнімдегі барлық қышқылдар мен олардың қышқыл тұздарының құрамын айтады. Титрленетін қышқылдықты анықтау әдісі индикатор ретінде фенолфталеиннің қатысуымен өнімнің құрамындағы қышқылдарды натрий гидроксиді ерітіндісімен бейтараптандыруға негізделген. Ол Тернер градусымен (°Т) көрсетіледі және жаңа сауылған сүт үшін 16-18 °Т құрайды. Титрленетін қышқылдықты анықтайтын сүт

өнімдерінің негізгі құрамдас бөліктеріне кальцийдің, натрийдің, калийдің қышқыл фосфатты тұздары, лимон қышқылы тұздары, көмірқышқыл газы, белоктар жатады. Сүттің титрленетін қышқылдығын құруға ақуыздардың қатысуы 3-4 °Т құрайды. Сүт пен сарысуды сақтау кезінде лактозадан сүт қышқылының түзілуіне байланысты титрленетін қышқылдық жоғарылайды. Бірақ сүттің қышқылдық қасиетін сүттің құрамындағы қышқылдар мен қышқыл тұздардың электролиттік диссоциация-

сы нәтижесінде түзілетін сутегі иондары ғана анықтап қоймайды [28].

Белсенді қышқылдық – бұл сүт пен сарысудың сапа көрсеткіштерінің бірі. Белсенді қышқылдық (рН) сутегі иондарының концентрациясымен анықталады. Өнім ақуыздарының коллоидтық күйі, пайдалы және зиянды микрофлораның өсуі, термиялық тұрақтылық, ферменттердің белсенділігі рН мәніне байланысты болады. Осыған байланысты біз сарысу үлгілерінің титрленетін қышқылдығын зерттедік (2-сурет).



2-сурет – Сүт сарысуы үлгілерінің титрленетін қышқылдығы

2-суретте көрсетілгендей, сарысудың титрленетін қышқылдығы уақыт өте келе жоғарылайды. «Меркі ірімшік зауыты» ЖШС ірімшік сарысуының үлгілерінде титрленетін қышқылдықтың жоғары көрсеткіштері байқалады, бұл үлгілердегі қышқылдық 90-114°Т шамасында ауытқиды. «Amiran» ЖШС сүзбе сарысуында титрленетін қышқылдық 98-110°Т, ал «Stella Alpina» ЖШС ірімшік сарысуында 19-23°Т болды. Сарысу үлгілерінің титрленетін қышқылдығы 19-дан 114°Т-ге дейін. Нормативтік құжаттарға сәйкес ірімшік сарысуының қалыпты титрленетін қышқылдығы 20°Т болса, сүзбе және казеин сарысуында бұл деректер сәйкесінше 70-75°Т шамасында ауытқиды.

Көбінесе көптеген ғалымдарды рН мәнімен (ортадағы сутегі иондарының концентрациясы) сипатталатын титрленетін қышқылдық (Тер-

нер дәрежесіндегі қышқылдық) және белсенді қышқылдық (немесе шынайы қышқылдық) арақатынасы қызықтырады. Сүзбе сарысуы үшін орташа белсенді қышқылдық рН 4,0-ден 5,0 бірлікке дейінгі диапазонда болады. Дегенмен, қышқылдық көптеген факторларға байланысты: бастапқы сүт шикізатының сипаттамалары, температура, сақтау ұзақтығы (рН төмендейді). Сонымен қатар, қоректік ортаны дайындау үшін (бактериялық ашытқыларды өндіру кезінде) сүзбе сарысуы тазартылады және белгілі бір температуралық көрсеткішке дейін жеткізіледі, мысалы, қышқылсыздандырылады (рН 6,0-6,5 және одан жоғары). Осылайша, табиғи сүзбе сарысуы мен өңделген сарысудың рН мәні айтарлықтай ерекшеленеді. Біз сарысу үлгілерінің белсенді қышқылдығын зерттедік (4-кесте).

4-кесте – Белсенді қышқылдығы – сүт сарысуы үлгілерінің рН мәні

Сарысу	24 сағат	48 сағат	72 сағат
Amiran ЖШС (сүзбе сарысуы)	5	4.8	4.6
Stella Alpina ЖШС (ірімшік сарысуы)	5.6	5.5	5.3
«Меркі ірімшік зауыты» ЖШС	4.9	4.7	4

4-кестеден көріп отырғанымыздай, «Amiran» ЖШС сүзбе сарысуының белсенді қышқылдығының (рН) мәні рН 5-тен рН 4,6-ға дейін өзгерді. «Stella Alpina» ЖШС ірімшік сарысуының белсенді қышқылдығы рН 5,6 – рН 5,3 болса, «Меркі ірімшік зауыты» ЖШС ірімшік сарысуының мәні (рН) рН 5,6 – рН 5,3 шегінде ауытқиды.

Осылайша, біз өз жұмысымызда сүт сарысуының физика-химиялық және органолептикалық қасиеттерін зерттедік, биоэтанол өндірісінде қолдану үшін сүт сарысуының қасиеттеріне сипаттамалар бердік.

Сүт сарысуының микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері және таксономиялық құрамы

Сүт сарысуы микроорганизмдердің дамуы үшін жақсы қоректік орта болып табылады, олардың шығу тегі пастерленген сүттің қалдық ыстыққа төзімді және термофильді микрофлорасымен де, өнімдерді өндіруде қолданылатын ашытқы микрофлорасымен де байланысты. Түрлі тәсілдермен алынған сүзбе сарысуының микрофлорасының құрамы әртүрлі болуы мүмкін. Сарысуда өзіне тән ашытқы микрофлорасы бар, сонымен қатар бөтен микрофлораны, мысалы, пастерлеуден кейін қалатын ыстыққа төзімді түйіршікті таяқшаларды табуға болады.

Жаңа піскен ірімшік сарысуының микрофлорасы сүтқышқылды микроорганизмдермен, ашытқылармен және спора түзетін таяқшалармен ұсынылған, сонымен қатар ол коккты да, таяқша тәрізді де ыстыққа төзімді микрофлораны сақтайды. Ірімшік сарысуының микрофлорасында ішек таяқшалары тобының бактериялары, лактозаны ашытатын сүтқышқылды микроорганизмдер сүтқышқылды микроорганизмдері, гетероферментативті сүт қышқылы бактериялары, ыстыққа төзімді микрофлора, микроорганизмдердің ашытқы дақылдары, ашытқы және зең саңырауқұлақтары анықталуы мүмкін. Сүзбе сарысуының микрофлорасының

құрамында кокк, диплококк және таяқша тәрізді пішінді ашытқының мезофильді микрофлорасы бар [29].

Жұмыста біз сүт сарысуының 3 үлгісінің микробиологиялық көрсеткіштері мен микробтық қоғамдастықтың таксономиялық құрамын зерттедік. Сүт сарысуы үлгілерінің микрофлорасын анықтау және ашытқы мен лактобактериялардың таза дақылдарын бөлу үшін Кох әдісімен MRS, Sabourand Dextrose Agar және ЕПА сияқты қатты қоректік ортаға себу жүргізілді. Сарысу үлгілерінің микробтық қауымдастығының таксономиялық құрамы 3 суретте көрсетілген.

Микробиологиялық талдау, зерттелген үлгілердің микроскопиясы сарысу үлгілерінде бөгде микрофлораның болуын анықтаған жоқ. Өнімдердің микробиологиялық көрінісі негізінен ашытқылар, лактобактериялар және лактококктар дақылдарымен ұсынылған..

Сурет 3 –те көрсетілгендей, MRS қатты қоректік ортасында КТБ сүт қышқылы бактерияларының саны $2,5-7,2 \times 10^7$ КТБ/мл құрады. Sabourand Dextrose Agar ортасында ашытқы колонияларының саны $2,8-3,9 \times 10^7$ КТБ/мл болды. ЕПА әмбебап ортасында гетеротрофты микроорганизмдердің саны $1,2-2,8 \times 10^7$ КТБ/мл құрады, бұл элективті ортада өскен микроорганизмдермен салыстырғанда төмен. Бұл сүт сарысуының микрофлорасында лактозаны ашытатын ашытқы және сүт қышқылы бактериялары сияқты сүт қышқылы микроорганизмдерінің өкілдері басым болатындығына байланысты.

Бұл жұмыста сүт сарысуы үлгілерінен ашытқы және сүт қышқылы бактериялары бөлініп алынды. Сүт сарысуынан ашытқы дақылдарын бөліп алу дәстүрлі микробиологиялық әдіспен жүргізілді.

Ашытқының жинақтаушы культурасын алу олардың құрамында қант бар субстраттарда әлсіз қышқылдық реакциямен өсу қабілетіне және этил спиртіне төзімділігіне негізделген. Ашытқының жинақталуы қоректік ортада тұнба мен олардың өмірлік белсенділігінің тән өнімдерінің болуымен және микроскопиялық жолмен визуалды түрде анықталды, ал лактобактериялар микроскоппен анықталды [30].

Ашытқы және сүт қышқылы бактерияларының штаммдарының түрлік тиістілігін анықтау үшін дәстүрлі әдістермен морфологиялық-культуралық қасиеттері зерттелді [31, 32]. Таңдалған ашытқы мен сүт қышқылы бактерияларының морфологиялық және культуралық қасиеттері 5 кестеде келтірілген.



3-сурет – Өртүрлі коректік орталарда таксономиялық топтардың микроорганизмдерінің өсуі

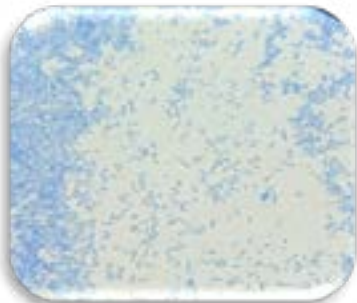
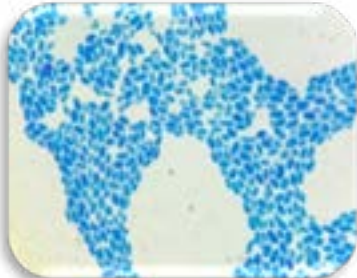
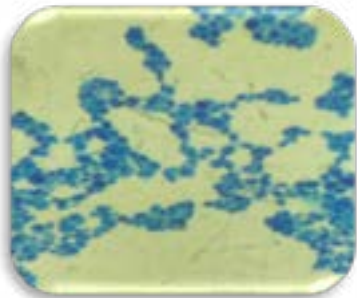
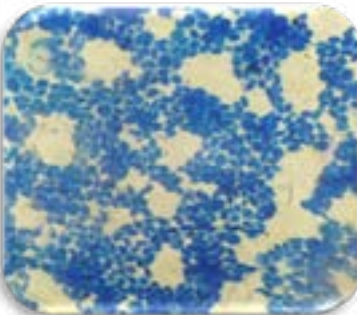
5-кесте – Ашытқы мен сүт қышқылы бактерияларының морфологиялық-культуралық белгілері

Куль тура	Колониялардың сипаттамасы	Клетканың морфологиясы және мөлшері	Вегетативті көбею
М1	Колониялар ақ түсті, нүктелі дөңгелек колониялар шеттерінде мөлдір	Клеткалар кокка тәрізді, көлемі 0,8 мкм, клеткалар бір-бірінен бөлек, жұп немесе ұзындықтары әртүрлі тізбектерде орналасқан	Екіге бөліну
А1	Колонияның шеттері тегіс емес шырышты, негізі ақ, дөңес, беті жылтыр	Клеткалар цилиндр тәрізді, ұзынша, көлемі 1,5 – 4,6 мкм	Бүршіктену
ГБ	Колониялардың пішіні дөңгелек, ортаңғы колониялар, үстінгі беті дөңес колониялардың бедері күңгірт	Клеткалары жұмыртқа тәрізді, көлемі 1,6 -5,2 мкм түйіршіктер түрінде	Бүршіктену
ГТ	Ірі колониялар, ортасы дөңес емізік тәрізді ақ түсті колониялар бедері және шетінде роликті, беті жылтыр, ақ түсті, сүзбе-түйіршікті консистенциясы жылтыр	Көлемі 1,8 – 6,1 мкм дөңгелек пішінді клеткалар	Бүршіктену

5-кестеден көріп отырғанымыздай, ашытқы штаммдары қатты ортаның бетінде дөңгелек пішінді, орташа колониялар, төбесі дөңес колониялардың күңгірт бетін, сонымен қатар үлкен колониялар, емізік тәрізді дөңес ақ ортасы бар колониялардың рельефі және шеткі жағындағы ролик сияқты, жылтыр, ақ, сүзбе-түйіршікті консистенциялы жылтыр бетін түзеді. Қатты MRS ортасындағы сүт қышқылы бактериялары ақ, нүктелі, шеттері мөлдір

дөңгелек колониялар түзеді. Вегетативті көбею әдісі бойынша ашытқылардың А1, ГТ, ГБ штамдары бүршіктену арқылы, М1 сүтқышқылды бактериялар клеткалардың екілік бөлінуі арқылы көбейеді. Ашытқы клеткаларының өлшемдері 1,5-6,1 мкм аралығында өзгереді, М1 штаммының клетка өлшемі 0,8 мкм. Ашытқылар мен сүтқышқылды бактериялар штамдарының макро және микроморфологиясы 6-кестеде келтірілген.

6-кесте – Ашытқы штамдары мен сүт қышқылы бактерияларының макро және микроморфологиясы

№	Ашытқы және сүт қышқылы бактерияларының штамдарының макроморфологиясы	Ашытқы және сүт қышқылы бактерияларының штамдарының микроморфологиясы
1	М1 	
2	А1 	
3	ГТ 	
4	ГБ 	

Осылайша, жұмыста сүт сарысуының микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері мен таксономиялық құрамы зерт-

телді. Әрі қарай зерттеу үшін сарысу үлгілерінен ашытқылардың 3 штамы және 1 сүт қышқылы бактериялары штамы бөлініп алынды.

Ашытқы мен сүт қышқылы бактерияларының бөлінген штамдарын молекулярлық-генетикалық идентификациялау

Сүт қышқылы бактерияларды идентификациялау ITS аймағының (генаралық транскрипцияланған аймақ) тікелей нуклеотидтер тізбегін анықтау әдісімен жүзеге асырылды, содан кейін нуклеотидтердің сәйкестігін GeneBank халықаралық деректер базасында депонирленген тізбектермен анықтау жүргізілді. (7-кесте) [33].

Секвенирлеу реакциясынан кейін ПТР өнімін екінші тазарту BigDye X Terminator Purification Kit секвенирлеу реакцияларын тазарту жиынтығымен жүргізілді және капиллярлық форезді жүргізу үшін ABI3500 генетикалық анализаторына жүктелді.

Анықталған штамдар генінің 16s rna нуклеотидтік тізбегі талданды және SeqA (Applied

Biosystems) бағдарламалық жасақтамасында жалпы бірізділікке біріктірілді. Ұзындығы шамамен 600 п. н. нуклеотидтер реттілігін алғаннан кейін, GeneBank Халықаралық деректер базасында BLAST алгоритмі бойынша сәйкестендіру жүргізілді. Анықталған штамдар генінің 16s rRNA нуклеотидтік тізбегі талданды және SeqA (Applied Biosystems) бағдарламалық жасақтамасында жалпы бірізділікке біріктірілді. Ұзындығы шамамен 600 н.ж. нуклеотидтер реттілігін алғаннан кейін, GeneBank Халықаралық деректер базасында BLAST алгоритмі бойынша сәйкестендіру жүргізілді [34].

Зерттелетін штамдардың 16S rRNA ген тізбегінің нуклеотидтер тізбегі және филогенетикалық талдау нәтижелері генетикалық қашықтықтарды есептеу үшін Neighbor-Joining кластер әдісін қолдану арқылы MEGA6 бағдарламасында салынған ағаштар түрінде ұсынылған.

7-кесте – ITS аймағының нуклеотидті талдау әдісі бойынша идентификация нәтижелері

Штам атауы	ITS аймақтың фрагментінің реттілігі	Халықаралық деректер базасында нуклеотидтер тізбегін анықтау (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) BLAST алгоритмі		
		Gene Bank түгендеу нөмірі (Accession number)	Штам атауы	% сәйкестік
1	2	3	4	5
M1	ACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATT TGGAACGAATGCTAATACCGCATAAAACTTTAAACA CAAGTTTAAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAA GATGATCCCCGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAG GCTACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGG TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGAC GAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG GTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAAG TTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTA CCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGATTATTGG GCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCTGGTGT AAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAACT GGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCAT GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACC GGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTGAAGTGA AGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT	NR 113960.1:91-767	<i>Lactococcus lactis</i>	100%

A1	CAACAACACCTAAACATGAATACTTACTAGTCACTAAGA AATCTAAAAGAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTT GGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATA CCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCT TGAACGCACATTGCGCCCTCCGGCATTCCGGGGGGCAT GCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGCCTAAGCAGAG TTGGGGTTGTC	MT136542.1:43-283	<i>Candida inconspicua</i>	100%
ГБ	CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTT CTTGATTCTCTGCTATCAGTTTTCTATTTCTCATCTAAA CACAATGGAGTTTTTCTCTATGAACACTTCCCTGGAG AGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATT TGATTATGAAAAAATACTTATACTATAAAATTTAATATTCA AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATG AAGAACGCAGCGAATTGCGATATGATTGTGAATTGCAG ATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGC CCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAT TTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACT CGTCTCGGGTTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATC TGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGA CTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCTGTG GTAAGCTTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGA CTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTTAAC CAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGT ACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATA	MT187614.1:38-687	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	100%
ГТ	CGTCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTT CTTGATTCTCTGCTATCAGTTTTCTATTTCTCATCTAAA CACAATGGAGTTTTTCTCTATGAACACTTCCCTGGAG AGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATT TGATTATGAAAAAATACTTATACTATAAAATTTAATATTCA AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATG AAGAACGCAGCGAATTGCGATATGATTGTGAATTGCAG ATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGC CCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCAT TTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACT CGTCTCGGGTTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATC TGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGA CTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCTGTG GTAAGCTTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGA CTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTTAAC CAAACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGT ACCCGCTGAACCTTAAGCAT	MT187614.1:38-680	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	100%

Филогенетикалық ағаш зерттелетін үлгінің ITS аймағын International Blast дерекқорында орналастырылған референттік штаммдардың реттілігімен салыстыру арқылы құрастырылған.

NR 113960.1: 91-767 *Lactococcus lactis* штаммы NBRC 100933 ең жақын штаммымен гомология дәрежесі 100,00% құрады.

Жақын штамммен гомология дәрежесі MT136542.1:43-283 *Candida inconspicua* isolate OM6 100,0% құрады.

Филогенетикалық ағаш зерттелетін үлгінің ITS аймағын International Blast дерекқорында орналастырылған референттік штаммдардың реттілігімен салыстыру арқылы құрастырылған.

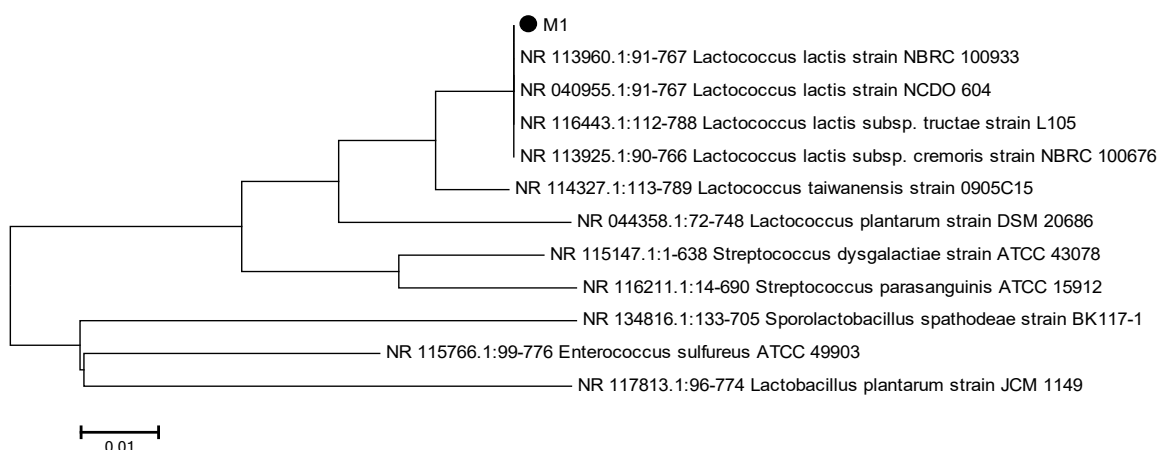
Ең жақын штамм MT187614.1:38-687 *Kluyveromyces marxianus* strain Cbm1 штаммы-

мен гомология дәрежесі 100,0% құрады.

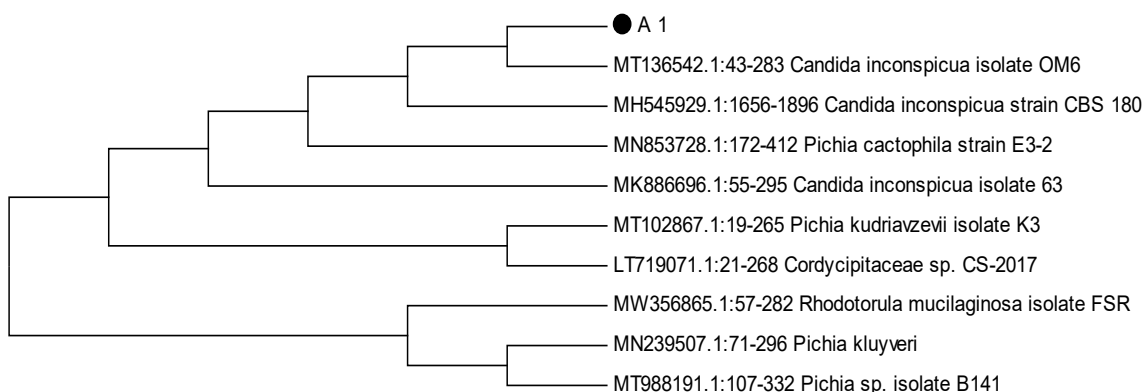
Филогенетикалық ағаш зерттелетін үлгінің ITS аймағын International Blast дерекқорында орналастырылған референттік штаммдардың реттілігімен салыстыру арқылы құрастырылған.

Ең жақын штамм MT187614.1:38-680 *Kluyveromyces marxianus* strain Cbm1 штаммымен гомология дәрежесі 100,0% құрады.

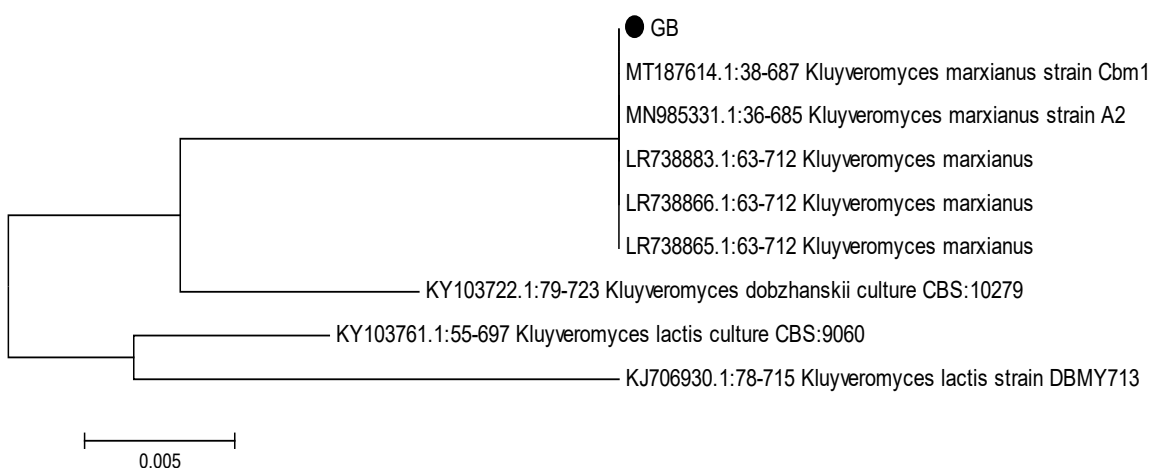
Ашытқылар мен сүт қышқылыды бактерияларының морфологиялық және дақылдық қасиеттерін дәстүрлі әдістермен зерттеу және ПТР талдау нәтижелері ашытқы мен сүт қышқылы бактерияларының штамдарын келесі түрлерге жатқызуға мүмкіндік берді: M1 штамы *Lactococcus lactis*, A1 *Candida inconspicua*, ГБ және ГТ штамдары – *Kluyveromyces marxianus*.



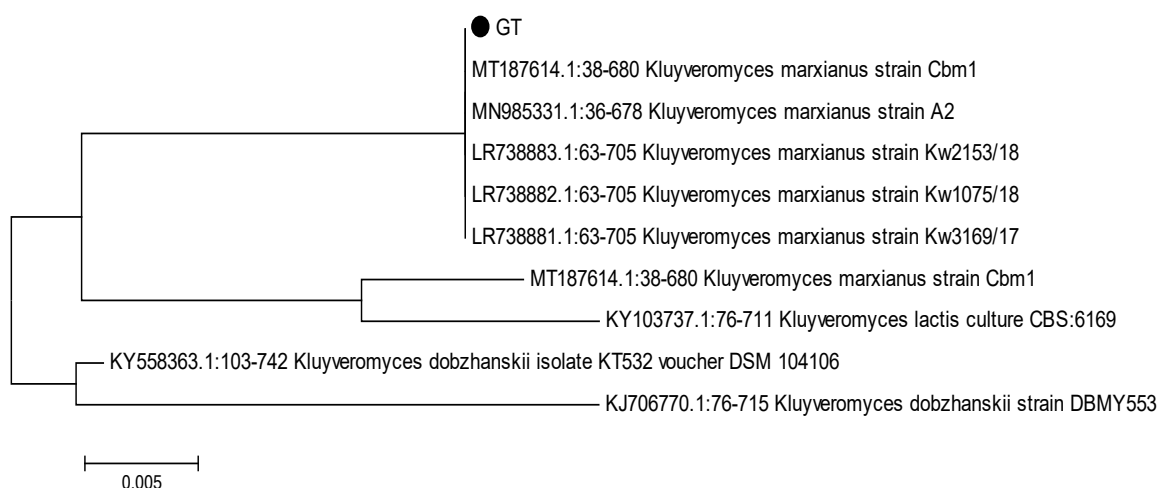
4-сурет – *Lactococcus lactis* M1 филогенетикалық ағашы



5-сурет – *Candida inconspicua* A1 филогенетикалық ағашы



6-сурет – *Kluyveromyces marxianus* (*Saccharomyces marxianus* синонимі) GB филогенетикалық ағашы



7-сурет – *Kluyveromyces marxianus* (*Saccharomyces marxianus* синонимі) ГТ филогенетикалық ағашы

Ашытқы клеткалары мен сүт қышқылы бактерияларының субстрат – сарысуға қатысты биохимиялық белсенділігі.

Сүт сарысуы ақуызды заттардың синтезі үшін толық шикізат болып табылады, өйткені оның құрамында көмірсулар (лактоза), минералды тұздар және витаминдер айтарлықтай мөлшерде болады. Сарысудағы ең қолайлы протеин продуценті лактозаны тамақтану үшін пайдалану мүмкіндігі бар ашытқы болып табылады. Орташа алғанда абсолютті құрғақ ашытқы (АҚА) құрамында 45-50% азотты заттар, 2-5% май, 25-35% көмірсулар, 6-8 күл болады. Сонымен қатар құрамында азот бар қосылыстар биологиялық жағынан толық болып табылады, өйткені олар ақуыздар (70%), амин қышқылдары және нуклеотидтер (15%), пурин (8-10%) және пиримидиндік (4%) негіздерден тұрады.

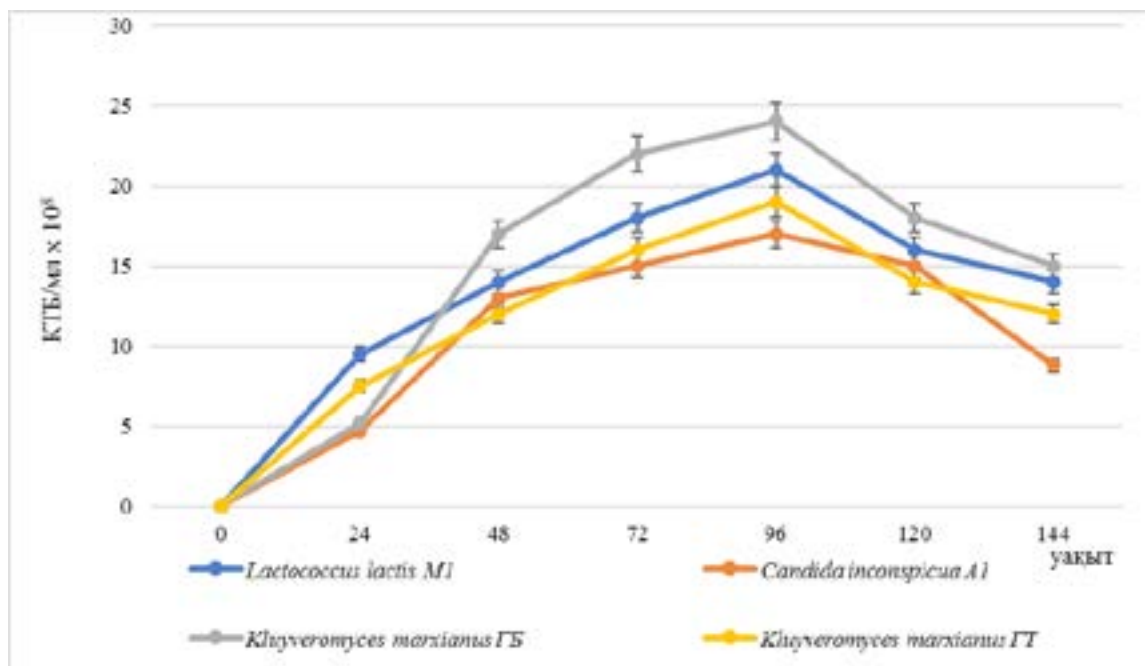
Ашытқыларды қолдану арқылы сарысудағы микробтық синтез бойынша мақсатты зерттеулерді проф. М. В. Залашко және оның студенттері жүргізеді. Зерттеу нәтижелері био-ЗЦМ рецептуралары бойынша құнды азық өнімдерін жасауға негіз болды. Бұл рецептте негізгі құрамдас сүт сарысуы болып табылады, онда арнайы ашытқы штаммы өсіріледі, тез өсуге қабілетті және биомассаның жоғары өнімін береді. Сарысуда өсірілген бұл ашытқының ақуызы алмастырылмайтын аминқышқылдарының болуымен ғана емес, сонымен бірге олардың құрамы бойынша да сүт протеиніне ұқсас. Бұл ашытқылардың маңызды

қасиеті сарысудың барлық түрлерінде бірдей жақсы өседі [35, 36].

Әрі қарай, біз өз жұмысымызда сүт сарысуының үлгілерінде ашытқы және сүт қышқылы бактерияларының өсу динамикасын зерттедік. Нәтижелер 4-суретте көрсетілген.

8-суреттен көрініп тұрғандай, сүт сарысуындағы ашытқы дақылдарының өсу динамикасын зерттеу нәтижесінде барлық штамдар биомассаның жинақталуының жоғары қарқындылығын көрсетті. Ашытқы штамдарының ішінде *Kluyveromyces marxianus* ГБ штаммы сарысуға қатысты жоғары биохимиялық белсенділік көрсетті, олардың клеткаларының саны $2,4 \times 10^9$ КТБ/мл болды. Ал *Candida inconspicua* A1 және *Kluyveromyces marxianus* ГТ штамдарында клеткалар саны $1,7 \times 10^9$ - $1,9 \times 10^9$ КТБ/мл аралығында болды. Салыстырмалы түрде жоғары белсенділікті сүт қышқылы бактерияларының *Lactococcus lactis* M1 штаммы көрсетті, олардың клеткаларының саны $2,1 \times 10^9$ КТБ/мл болды.

Әдеби деректерге сәйкес, белгілі микроорганизмдердің ішінде ашытқы сарысуының микробтық ақуызға айналуының ең жоғары жылдамдығына ие. *Kluyveromyces marxianus* ашытқысының көміртегі көзі ретінде лактоза мен инулинді пайдалану және жоғары белсенді β-фруктофуранозидаза өндіру қабілеті бар. Олар жоғары өсу қарқынымен ерекшеленеді және ақуыз өндірісі үшін биотехнологиялық салаларда кеңінен қолданылады [37]. Бұл деректер біздің зерттеу нәтижелерімізбен расталады.



8-сурет – Сүт сарысуындағы аштыкы және сүт қышқылы бактерияларының өсу динамикасы

Аштыкылар өсу процесінде энергия көзі ретінде сарысу лактозаны және сүт қышқылын пайдалана отырып, құрамында минералды азот бар тұздарды толық клеткалық ақуызға айналдырады. Әдеби деректерге сүйенсек, аштыкы сарысуындағы ақуыз мөлшері бастапқы сарысуға қарағанда едәуір жоғары [38].

Сүт сарысуында жеңіл сіңірілетін көміртек көздерінің және өсу факторларының болуы оны биотехнологиялық процестерде перспективалы шикізат деп санауға мүмкіндік береді [39]. Сонымен қатар, сарысуды толық және ұтымды пайдалану мәселесі экономикалық тұрғыдан да, экологиялық тұрғыдан да өзекті болып табылады.

Осылайша, сарысуды өндеудің әртүрлі әдістері белгілі, дегенмен барлық нұсқалардың ішінде спирт алу үшін лактозаны ашытатын аштыкының әртүрлі дақылдарымен сарысуды ашыту бүгінгі күнге дейін өзекті болып қала береді және зерттеушілердің қызығушылығын тудырады.

Қорытынды

1. ЖШС «Мерке ірімшік зауыты», ЖШС «Амиран» (сүт сарысуы), ЖШС «Стелла Альпина» (ірімшік сарысуы) сүт сарысуларының физика-химиялық және органолептикалық қасиеттері зерттелді.

2. Сүт сарысуының 3 үлгісінің микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері және таксономиялық құрамы зерттелді. Сүт сарысу микробтық қауымдастығының таксономиялық құрамында лактозаны ашытатын аштыкылар мен лактобактериялар басым екені анықталды. Сүт сарысу үлгілерінен аштыкылардың 3 штаммы және сүт қышқылды бактериялардың 1 штамы бөлініп, олардың морфологиялық -культуральдық қасиеттері зерттелді.

3. Аштыкылар мен сүт қышқылы бактерияларының дақылдарын түрге дейін идентификациялау ПТР талдау әдісімен жүргізілді. GB және GT штаммдары *Kluyveromyces marxianus* түріне, M1 штамы – *Lactococcus lactis*, A1 – *Candida inconspicua* түріне дейін идентификацияланды.

4. Микроорганизм дақылдарының ішінде *Kluyveromyces marxianus* GB штаммы және сүт қышқылы бактериясы *Lactococcus lactis* M1 дақылы сүт сарысуында жоғары биохимиялық белсенділік көрсетті.

Зерттеу жұмысы ҚР БҒМ қаржыландырған №0221РК00252 ИРН AP09258285 «Иммобилизацияланған аштыкы клеткалары негізінде сүт сарысуын үздіксіз ферментациялау жолымен биоэтанол алу» жобасы аясында жасалды.

Әдебиеттер

- 1 Zafar S, Owais M (2006) Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Eng J* 27:295-298
- 2 Wee Y-J, Kim J-N, Ryu H-W (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotech* 44:163-172
- 3 Boze H, Moulin G, Galzy P (1995) Production of Microbial Biomass. In: *Biotechnology Set*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp 165-220.
- 4 Browne H (1941) Ethyl alcohol from fermentation of lactose in whey. *Ind Eng Chem News Ed* 19:1272-1276
- 5 Domingues L, Lima N, Teixeira JA. 2001. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 72:507-514.
- 6 Перегудов, С.С. Отходы в доходы / С.С. Перегудов // Торгпред – 2005. – № 1. – С. 28.
- 7 Flores SH, Alegre RM (2001) Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. *Biotechnol Appl Biochem* 34:103-107
- 8 Gabardo S, Rech R, Rosa CA, Ayub MAZ. 2014. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy* 69:89-96.
- 9 González-Toledo SY, Domínguez-Domínguez J, García-Almendárez BE, Prado-Barragán LA, Regalado-González C (2010) Optimization of Nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented Whey as alternative culture medium. *J Food Sci* 75:M347-M353
- 10 Speedy A.W. Overview of world feed protein needs and supply // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop. – Bangkok. – 2004. – № 1. – P. 9 – 29.
- 11 Toride Y. Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding // Protein sources for the animal feed industry. – Bangkok. – 2004. – № 1. – P. 161 – 167.
- 12 Kaur R, Panesar PS, Singh RS. (2015) Utilization of Whey for the Production of β -Galactosidase Using Yeast and Fungal Culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 9:690-694.
- 13 Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28:375-384
- 14 Crampton E.W. Protein Problem in Animal Feeding // *Can J Comp Med Vet Sci*. – 1943. – № 7(11). – P. 321 – 326.
- 15 Liu X, Chung Y-K, Yang S-T, Yousef AE (2005) Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochem* 40:13-24
- 16 Mansour MH, Ghaly AE, Ben-Hassan RM, Nassar MA (1993) Modeling batch production of single cell protein from cheese whey. *Appl Biochem Biotechnol* 43:1-14
- 17 Markus CR, Olivier B, de Haan EH (2002) Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am J Clin Nutr* 75:1051-1056
- 18 Marwaha SS, Kennedy JF (1988) Whey-pollution problem and potential utilization. *International J Food Sci Tech* 23:323-336
- 19 Moulin G, Galzy P (1984) Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1:347-374
- 20 Bourdichona S. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use // *International Journal of Food Microbiology*. – 2012. – Vol. 154, № 3. – P. 87 – 97.
- 21 Doelle H.W. Microbial cultures in the utilization of cellulosic materials // *Biotechnology Advances*. – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 1 – 19.
- 22 Xiuzhi S.S. Isolation and Processing of Plant Materials // *Bio-Based Polymers and Composites*. – Academic Press, 2015. – Chapter 3. – P. 33 – 35.
- 23 Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. – М.: Академия, 2005. – 608 с. 6
- 24 Игнатова Л.В. Основы микробиологии: Учебное пособие. – Алматы: Қазақ Университеті, 2008. – С. 128.
- 24 Эрнст, Л. К. Животноводство России 2001–2010 гг. / Л. К. Эрнст // *Зоотехния*. – 2001. – № 10. – С. 2–8.
- 25 Зарипова, Г. К. Адаптивные технологии кормопроизводства в Башкортостане: рекомендации / Г. К. Зарипова [и др.]. – Уфа, 2004. – С. 76.
- 26 Lijuan G. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria // *Bioresource Technology*. – 2008. – № 99 (8). – P. 2742 – 2748.
- 27 Paul J. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. – 2008. – № 11(1). – P. 40-44
- 28 Dale Bruce E. Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology // *Trends Biotchnol*. – 2000.-Vol.5. № 10. – P.287-291.
- 29 Norman F. Fermented cereals a global perspective // *FAO agricultural services bulletin*. – №138. – 2009. – P. 268.
- 30 Ефимова М.В. Введение в прикладную биотехнологию. – Петропавловск: КамчатГТУ, 2004. – 96 с.
- 31 Тарабукин Д.В. Ферментативные технологии направленной биоконверсии целлюлозо- и крахмалсодержащего растительного сырья: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. Институт биологии Уфимского научного центра РАН. – Уфа, 2009. – С. 26.
- 32 Дедков В.Н. Разработка биотехнологии кормового белка из растительного сырья: дис. ... канд. техн. наук: 03.01.06. Орловский государственный аграрный университет. – Воронеж, 2014. – С. 146.
- 33 Carlsson R. Amaranth species and related species for leaf protein concentrate production // *Proceedings of 1st Amaranth conf.*, Rodale Press Inc., Emmaus. – 2017. – P. 83 – 99.

- 34 Lan A.O. et. al. The competitive growth of bloc- forming and bilamentous bacteria model for activated sludge bulging journal W.P.C.F.- 1984. Vol.56 № 1. – pp. 83.
- 35 Anvari M, Khayati G (2011) Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and nutritional profile analysis. *Advance J Food Sci Tech* 3: 122-126.
- 36 Лыско Ксения Андреевна. Разработка технологии дрожжевых обогатителей пищи на базе молочной сыворотки и растительного сырья : диссертация... кандидата технических наук: 05.18.10. – М., 2007. – 268 с. РГБ ОД, 61:07-5/2469
- 37 Соколенко Г.К. Пономарева И.Н. и др. Биотехнология дрожжесывороточного продукта. 2016. – С. 188.
- 38 Bajpai P, Gera RK, Bajpai PK (1992) Optimization studies for the production of α -amylase using cheese whey medium. *Enzyme Microb Technol* 14:679-683
- 39 Bansal S, Oberoi HS, Dhillon GS, Patil R (2008) Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. *Indian J Appl Microbiol* 48:337-341

References

- 1 Anvari M, Khayati G (2011) Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and nutritional profile analysis. *Advance J Food Sci Tech* 3: 122-126.
- 2 Bajpai P, Gera RK, Bajpai PK (1992) Optimization studies for the production of α -amylase using cheese whey medium. *Enzyme Microb Technol* 14:679-683
- 3 Bansal S, Oberoi HS, Dhillon GS, Patil R (2008) Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. *Indian J Appl Microbiol* 48:337-341
- 4 Boze H, Moulin G, Galzy P (1995) Production of Microbial Biomass. In: *Biotechnology Set*. Wiley-VCH Verlag GmbH, pp 165-220.
- 5 Browne H (1941) Ethyl alcohol from fermentation of lactose in whey. *Ind Eng Chem News Ed* 19:1272-1276
- 6 Bourdichona S. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use // *International Journal of Food Microbiology*. – 2012. – Vol. 154, № 3. – pp. 87 – 97.
- 7 Carlsson R. Amaranth species and related species for leaf protein concentrate production // *Proceedings of 1st Amaranth conf.*, Rodale Press Inc., Emmaus. – 2017. – pp. 83 – 99.
- 8 Crampton E.W. Protein Problem in Animal Feeding // *Can J Comp Med Vet Sci*. – 1943. – № 7(11). – pp. 321 – 326.
- 9 Dale Bruce E. Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology // *Trends Biotchnol*. – 2000.-Vol.5. № 10. – pp.287-291.
- 10 Dedkov V.N. Razrabotka biotekhnologii kormovogo bel'ka iz rachtel'nogo tsikla: dits. ... kand. tekhn. data: 03.01.06. Orlovskiy gosudarstvennyy agrarnyy univercitet. – Voronezh. – 2014. – pp. 146.
- 11 Doelle H.W. Microbial cultures in the utilization of cellulosic materials // *Biotechnology Advances*. – 2014. – Vol. 2, № 1. – pp. 1 – 19.
- 12 Domingues L, Lima N, Teixeira JA. 2001. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculent yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 72:507-514.
- 13 Ernst, L. K. Zhivotn_ vo Rossii 2001–2010 gg. / L. K. Ernst // *Zootekhnika*. — 2001. — № 10. — pp. 2–8.
- 14 Flores SH, Alegre RM (2001) Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. *Biotechnol Appl Biochem* 34:103-107
- 15 Gabardo S, Rech R, Rosa CA, Ayub MAZ. 2014. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. *Renew Energy* 69:89-96.
- 16 González-Toledo SY, Domínguez-Domínguez J, García-Almendárez BE, Prado-Barragán LA, Regalado-González C (2010) Optimization of Nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented Whey as alternative culture medium. *J Food Sci* 75:M347-M353
- 17 Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L (2010) Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* 28:375-384
- 18 Kaur R, Panesar PS, Singh RS. (2015) Utilization of Whey for the Production of β -Galactosidase Using Yeast and Fungal Culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 9:690-694.
- 19 Lan A.O. et. al. The competitive growth of bloc- forming and bilamentous bacteria model for activated sludge bulging journal W.P.C.F.- 1984. Vol.56 № 1. – pp. 83.
- 20 Лыско Ксениа Андреевна. Razrabotka tekhnologiy drozhzhevykh obogatiteley pishchi na osnove molochnoy syvorotki i rastitel'nogo syr'ya : dissertatsiya... kandidata tekhnicheskikh nauk : 18.05.10 Moskva, 2007 268 s. RGB OD, 61:07-5/2469
- 21 Lijuan G. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria // *Bioresource Technology*. – 2008. – № 99 (8). – pp. 2742 – 2748.
- 22 Liu X, Chung Y-K, Yang S-T, Yousef AE (2005) Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochem* 40:13-24
- 23 Mansour MH, Ghaly AE, Ben-Hassan RM, Nassar MA (1993) Modeling batch production of single cell protein from cheese whey. *Appl Biochem Biotechnol* 43:1-14

- 24 Markus CR, Olivier B, de Haan EH (2002) Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am J Clin Nutr* 75:1051-1056
- 25 Marwaha SS, Kennedy JF (1988) Whey-pollution problem and potential utilization. *International J Food Sci Tech* 23:323-336
- 26 Moulin G, Galzy P (1984) Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1:347-374
- 27 Netrusova A. (2005) Bol'shaya masterskaya po mikrobiologii [Big workshop on microbiology] textbook. allowance for students. higher textbook. institutions under the editorship of M.: IC "Academy, no. 23. pp. 608.
- 28 Norman F. Fermented cereals a global perspective // *FAO agricultural services bulletin*. – №138. – 2009. – pp. 268.
- 29 Paul J. Effect of whey protein isolate on strength, body composition and muscle hypertrophy during resistance training. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. – 2008. – № 11(1). –pp. 40-44
- 30 Peregudov, S S. Vykhody v ustanovku / S.S. Peregudov // *Torgpred* – 2005. – № 1. -pp. 28.
- 31 Speedy A.W. Overview of world feed protein needs and supply // *Protein sources for the animal feed industry*. Expert Consultation and Workshop. – Bangkok. – 2004. – № 1. – pp. 9 – 29.
- 32 Sokolenko G.K. Ponomareva I.N. i dr. *Biotehnologiya drozhzhesyvorotochnogo produkta*. 2016. – pp. 188.
- 33 Tarabukin D.V. *Fermentativnye tekhnologii napravlennoy biokonvercii tsellyulozo- i krakhmalkoderzhashchego raktitel'nogo syr'ya*: avtoref. dik. ... kand. biol. data: 03.00.23. Inkstitut biologii Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN. – Ufa. -2009. – pp. 26.
- 34 Toride Y. Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding // *Protein sources for the animal feed industry*. – Bangkok. – 2004. – № 1. – pp. 161 – 167.
- 35 Yefimova M.V. *Vvedeniye v prikladnuyu biotehnologiyu*. -Petropavlovsk: KamchatGTU. – 2004. – pp. 96.
- 36 Wee Y-J, Kim J-N, Ryu H-W (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotech* 44:163-172
- 37 Xiuzhi S.S. *Isolation and Processing of Plant Materials // Bio-Based Polymers and Composites*. – Academic Press, 2015. – Chapter 3. – pp. 33 – 35.
- 38 Zafar S, Owais M (2006) Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem Eng J* 27:295-298
- 39 Zaripova, G. K. *Adaptivnyye tekhnologii kormoproizvodstva v Bashkortostane: rekomendatsii* / G. K. Zaripova [i dr.]. — Ufa, 2004. — pp. 76.

Г.Қ. Қамшыбаева¹, Б.Д. Қосалбаев^{1,2*},
А.К. Садвакасова¹, Б.К. Заядан¹

¹ «Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті» КЕАҚ, Қазақстан, Алматы қ.

² «Қ.И. Сәтбаев атындағы ҚазҰТЗУ» КЕАҚ, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: kossalbayev.bekzhan@gmail.com

АНАБАЕНА ЦИАНОБАКТЕРИЯЛЫҚ ТҮРЛЕРІНІҢ СҮТЕГІ ӨНДІРІСІНІҢ БОЛАШАҒЫ МЕН МӘСЕЛЕЛЕРІ

21 ғасырда дәстүрлі энергия көздерін бақылаусыз пайдалану Жер бетінің температурасын соңғы 1 ғасырда 2°C-ге жоғарылатты. Дәстүрлі энергия көздерінің теріс жақтары артуына байланысты микроорганизмдерден алынатын сүтегі өндірісі тез арада қарқынды зерттеу нысанына айналды. Бірақ, олардың биомассаның төмен концентрациясына байланысты микроорганизмдерден алынатын сүтектің (H₂) коммерциялық өндірісі әлі де жүзеге аспады. Осы тұрғыда, биотехнологияда активті түрде қолданылатын сүтек продуценттері – цианобактерия штаммдарын анықтап, сүтек бөлу мүмкіндіктерін арттыру жұмыстарын жүзеге асыру маңызды болып отыр. Бұл шолу мақаласында *Anabaena* цианобактериясының сүтегі өндірісіндегі маңыздылығы және олардың сүтек бөлу механизмдері зерттелініп, H₂ бөлінісіне әсер ететін негізгі факторларға шолу жасалды. Соңғы уақыттардағы сүтек бөлінісін жүзеге асыратын технологиялар қамтылып, химиялық және физикалық факторлардың әсері негізінде сүтек мөлшерінің артуы турасындағы жұмыстар қамтылды. *Anabaena* штаммдарының қазіргі таңдағы сүтек молекулаларын катализдеу мүмкіндігі төмен болғандықтан, болашақтағы зерттеу жұмыстары тек гендік инженерия технологияларымен ғана жүзеге асатын болады. Генетикалық, техникалық және метаболиттік зерттеу жұмыстарын қатар жүргізу арқылы ғана қазіргі таңдағы биосүтек индустриясында туындаған мәселелерді шешуге болады.

Түйін сөздер: цианобактериялар, *Anabaena* sp., H₂ өндірісі, биоэнергия.

G.K. Kamshybayeva¹, B.D. Kossalbayev^{1,2*}, A.K. Sadvakassova¹, B.K. Zayadan¹

¹ Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

² Satpaev University, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: kossalbayev.bekzhan@gmail.com

Outlooks and challenges of hydrogen production by cyanobacterial *Anabaena* species

Uncontrolled use of conventional energy sources in the 21st century has increased the temperature of the Earth's surface by 2°C in the last 1 century. Due to the increasing negative aspects of traditional energy sources, the production of hydrogen from microorganisms has quickly become an object of intense research. However, due to their low concentration of biomass, commercial production of hydrogen (H₂) from microorganisms has not yet been realized. In this context, it is important to identify strains of hydrogen producers – cyanobacteria, which are actively used in biotechnology, and to carry out work on increasing the possibilities of hydrogen separation. This review article examines the importance of the cyanobacterium *Anabaena* in hydrogen production and their hydrogen release mechanisms, and reviews the main factors affecting H₂ release. Recent technologies of hydrogen separation are included, as well as works on increasing the amount of hydrogen under the influence of chemical and physical factors. Due to the low ability of *Anabaena* strains to catalyze hydrogen molecules at present, future research will be limited to genetic engineering technologies. It is only possible to solve the problems arising in the current biohydrogen industry by conducting genetic, technical and metabolic research in parallel.

Key words: Cyanobacteria, *Anabaena* sp., H₂ production, Bioenergy.

Г.Қ. Қамшыбаева¹, Б.Д. Қосалбаев^{1,2*}, А.К. Садвакасова¹, Б.К. Заядан¹

¹НАО «Казахский национальный университет им. аль-Фараби», Казахстан, г. Алматы

²НАО «КазНУ имени К.И.Сатпаева», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: kossalbayev.bekzhan@gmail.com

Перспективы и проблемы производства водорода цианобактериями *Anabaena*

Бесконтрольное использование традиционных источников энергии в XXI веке привело к повышению температуры поверхности Земли на 2°C за последнее столетие. В связи с возрастающими негативными аспектами традиционных источников энергии производство водорода из микроорганизмов быстро стало объектом интенсивных исследований. Однако из-за их низкой концентрации биомассы коммерческое производство водорода (H₂) из микроорганизмов еще не реализовано. В связи с этим важно выявить штаммы продуцентов водорода – цианобактерий, которые активно используются в биотехнологии, и провести работы по увеличению возможностей выделения водорода. В этой обзорной статье рассматривается важность цианобактерий *Anabaena* в производстве водорода и их механизмы выделения водорода, а также рассматриваются основные факторы, влияющие на выделение H₂. Авторами исследуются новейшие технологии выделения водорода, а также работы по увеличению количества водорода под воздействием химических и физических факторов. Из-за низкой способности штаммов *Anabaena* катализировать молекулы водорода в настоящее время проводимые исследования будут ограничены технологиями геной инженерии. Решить проблемы, возникающие в современной биоводородной промышленности, можно только путем параллельного проведения генетических, технических и метаболических исследований.

Ключевые слова: цианобактерии, *Anabaena* sp., Производство H₂, биоэнергетика.

Кіріспе

Кез келген тіршілікті қозғалтатын энергия болғандықтан, адамдар ежелден бері қосымша энергия көзін іздеу үстінде. Осы негізде дәстүрлі жолмен алынатын технологиялар қалыптасып, олардың бәрі мұнай және көмір көзіне тікелей қатысты болып келді. Ал, соңғы жылдардағы технологиялардың дамуы жел, су, күн және биомасса сарқылмайтын энергияларын пайдалануға жол асты. Қазіргі таңда әлемдік жалпы энергия тұтыну мөлшерінің 35%-ын мұнай, 25%-ын табиғи газ, 28%-ын көмір және 7%-ын су электр станциялары құраса, ал қалған 5%-ы атом энергиясы мен баламалы энергия көздеріне тиесілі болып келеді [1].

Жалпы, баламалы энергия көзі болып саналатын биотын 4 ұрпаққа бөлінеді: 1-ші және 2-ші ұрпақ биотындарының негізінде алынған биодизель және этанол өнімдері таза су және тыңайқыштар көздерін қолданады және кең егістік алқаптарын қажет етеді. Ал, үшінші буын биотыны тікелей фототрофты микроорганизмдер (микробалдырлар, фототрофты бактериялар және цианобактериялар) түрлерімен тікелей байланысты болып келеді [2].

Цианобактериялардың ішінде H₂ бөлу үшін ең көп зерттелген түрлерге *Synechocystis* және *Anabaena* модельді объектілері жатады. Бұл екі түр де толыққанды геномдық секвенирленген және биоттының 4-ші ұрпағына қолдануға лайықты организмдер болып та-

былады. Себебі, 4-ші ұрпақтағы биотындар цианобактериялардың жаңа штаммдарын гендік инженерия арқылы модификациялау жұмыстарымен байланысты. *Anabaena* штаммдары H₂ молекулаларын бөлу үшін гидрогеноза (H₂аза) және нитрогеноза (N₂аза) ферменттерін биофотоллиз професін жүзеге асыру үшін қолданады. Клеткалық тұрғыда Күн энергиясы фотожүйе 2 (ФЖ2) комплексінде орналасқан антенна пигменттері арқылы сіңіріліп алынып, сызықтық-электрондық тасымалдау белоктары арқылы ФЖ1-ге барады, электрондардың саны артқан соң, ферродоксин (Фд) белогы арқылы клеткалық электрондар АУФ молекулалары түрінде қорға жинақталады. Бұл электрондар қажет болғанда сутек ферменттерінің қызметін активтендіруге қолданылады. Сонымен қатар, клеткалардағы H₂ шығымы тікелей сыртқы орта факторларына тәуелді болып келеді (температура, рН және т.б.) [3].

Баламалы отын ретінде биосутек өндірісін оңтайландыру үшін *Anabaena* штаммдарының көмегімен көптеген зерттеулер жүргізілді, мысалы, оларды өсіруді жақсарту әдістері, физика-химиялық өсу параметрлерін тікелей және жаңа биофотоллиз процестерінде өңдеу арқылы жүргізілген жұмыстар [4]. Цианобактериялардың қоршаған ортаға бейімделуі тез жүреді және олардың қарқындылығы жоғары болып келді. Сонымен қатар, олардың өсуі үшін қолайлы

жағдайлар болғанда, түрлер тығыздығын бірнеше сағат ішінде, тіпті жабық фотобиореакторларда да екі есе арттыра алады [5]. Бұл микроорганизмдердің биомасса алу жолдарын оңтайландыру сутегі өндірісіне тікелей әсер етеді, өйткені эффективті H_2 өндірісі үшін биомассаның өнімділігі биотехнологияда маңыздылық танытады [6-9].

Бұл организмдердің өсуін өзгертетін және биомассаның шығымы мен сутегі өндірісін арттыратын кейбір факторларға рН көрсеткіші, температура мөлшері, жарық қарқындылығы және органикалық көміртектің көзі жатады [10-12]. Цианобактерияларда глюкозаның қосылуы миксотрофиялық өсуге әкеледі, бұл биомассаның өнімділігі мен өсу қарқынының жоғарылауына ықпал етеді [13]. Сонымен қатар, штаммдарда клеткалық тұрғыдағы гидрогеназаның белсенділігін арттыруға болады [14] және органикалық көміртектің ыдырауы сутегі өндірісін белсендіре түседі [12]. Berberoglu және т.б. [15], Sveshnikov және т.б. [16], Vyas and Kumar [17], Tsygankov және т.б. [18], Yeager және т.б. [12], Markov және т.б. [19] сынды зерттеушілер *A. variabilis*, *A. cylindrica* штамдырымен белсенді түрде сутек өндірісін жүзеге асырды. Осы зерттеулерге сәйкес, сутектің ең жақсы өндірісі анаэробты жағдайда, азоттың бөлінуімен, аргондық кеңістікте жарықтың қатысуымен алынды. Цианобактериялардың сутегі өндірісінің артықшылықтары бар, өйткені, олар тотықпаған ортада екі бағытты гидрогеназаны қолдана отырып, тікелей биофотоллиз жүргізе алады, сонымен қатар, нитрогеназадан жанама биофотоллиз процесін жүзеге асыра алады [20].

Бұл шолуда *Anabaena* штаммының H_2 бөлу параметрлері тақыланып, болашақта әр түрлі технологиялардың перспективалары кеңінен қозғалған. Сонымен, сутек алудың биопроцестері қамтылып, әр түрлері параметрлерінің қолданылу нұсқалары көрсетілген. Соңғы жылдары *Anabaena* штаммымен жарияланған зерттеу жұмыстарына шолу жасалынып, болашағы мол түрлеріне тереңірек сипаттама жасалды. *Anabaena* штаммының биомассасын өндірісте қолдану мүмкіндіктері қарастырылып, болашақтағы маңыздылығы сипатталды.

Биосутек өндірісі – экологиялық таза процесс

H_2 энергиясы – ең таза, қалпына келетін энергия көзі болып табылады. Ол әлемде кең таралған және уыттылығы жоқ, түссіз және жоғары жанғыш газ болып табылады. Ол энергетикалық

тұрғыдан тиімділігі жоғары және басқа газдармен салыстырғанда эффективті болып табылады. Сутек энергиясының маңыздылығы – оның электрохимиялық жану процесстері болып табылады. H_2 энергиясының тағы бір оң жағы – ол жану барысында соңғы қалдық зат ретінде суды шығарады. Бұл процесс экономикалық тұрғыдан тиімді және атмосфераның ластануына жол бермейді. H_2 энергиясы өте эффективті болғанымен, оны табиғи ортадан бөліп алудың технологиясы қымбат болып табылады [21].

Қазірде H_2 энергиясы көбіне құрамында көмірсутектері бар қосылыстардан алынады: табиғи газ, көмір және химиялық металлдар. Бұл қосылыстарды өңдеу көбіне термокаталитикалық реформация және крекинг әдістері арқылы жүзеге асады. Бұл технологияларды қолдану оңай болғанымен, экономикалық тұрғыдан көптеген шығындарға алып келеді. Бұл қосындылардан H_2 өндірудің кемшілігі – субстраттың басқа да шикізат көзі болып қолданылуы болып табылады. Дәстүрлі жолдармен сутек өндіру шикізат көзіне бақталастықты арттырады және қоршаған ортаның ластануын жоғарылата түседі. Сондықтан, аталған мәселерді шешу мақсатында сутек энергиясын басқа да субстраттардан бөліп алу жұмыстары қарастырылады. Ол үшін қазіргі таңда электролиз, фотоэлектролиз және биосутекті өндіру үшін фотолизис технологиялары ойлап табылды. Солардың ішінде, болашағынан үміт күттіретін әдістердің бірі – күн энергиясына негізделген биоферментация болып келеді [22].

Био- H_2 энергиясы фотоферментация, қараңғы ферментация процесстері арқылы қарқынды түрде жүргізіледі. Соңғы 50 жылда фототрофты микроорганизмдердің мыңдаған түрімен тікелей және жанама биофотоллиз арқылы H_2 энергиясы көптеп бөлініп алынды. Соның ішінде бактериялар, цианобактериялар мен жасыл балдырлар ең басты зерттеу нысандарына айналды [23]. Басқа әдістермен салыстырғанда, цианобактериялардың активті штаммдарының (жабайы және модификацияланған) көмегімен H_2 өндірісі басқа әдістермен салыстарғанда ерекшеленеді. Биологиялық процестерге негізделген H_2 өндіру әдісі энергияны аз қажет етеді, олар күн сәулесі сияқты жаңартылатын көздерді пайдаланады және CO_2 көзін тек клеткалардың өсуіне ғана пайдаланады. Биофотоллиз процесі кезінде микроорганизмдер ауылшаруашылығы өсімдіктерімен бәсекеге түспейді және қоршаған ортаға зиян

келтірмейді, керісінше, ауаны оттегі көзімен байытуға үлесін қосады.

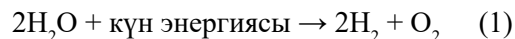
Сонымен қатар, цианобактериялар – көмірсу, липидтер, амин қышқылдары, биология қажетті дәрумендер, биоотындар және ақуыздар шығаруға қабілетті әлеуетті микроорганизмдер болып саналады. Айта кету керек, цианобактериялардың биомассасын косметикада, азық түлік өнеркәсіптерінде қарқынды түрде қолдануға болады. Цианобактериялардың ішінде *Anabaena* түрлерінің басым көпшілігінің клеткасының құрамы 30-40%-ы ақуыздардан тұрғандықтан олар ауыл шаруашылығы жануарларының азығы ретінде қолданылуы үстінде. Кейбір түрлерінің клетка биомассасының 5-10%-ы май қышқылдарынан тұрады, ол түрлер көбіне биодизель өндірісінде қолданылады. Сондықтан, Био-Н₂ өндірісін өміршең үрдіске айналдыру үшін, бұны жалғыз процесс ретінде ойлауды тоқтату керек, бірақ сол жасушалардан көбірек пайда алу үшін оны биологиялық тазартылған, интеграцияланған процесс ретінде дамытуды бастау маңызды болып табылады [24].

Микроорганизмдердің метаболизмінің жанама өнімі негізіндегі сутектің биохимиялық өндірісі – бұл қалпына келетін ресурстардан сутегі алудың жаңа технологиялық саласы болып табылады. Тірі ағзалардан Н₂ бөліп алу технологиясы жарты ғасырдан астам уақыт бойына зерттелгендігіне қарамастан, әлі күнге дейін толыққанды және мол өнім беретін технология қалыптаспады. Осы тұрғыда цианобактериялар жүргізетін биофототоллиз негізделген сутегі алу үдерісі соңғы 35 жыл ішінде белсенді зерттелді [25]. Осы уақыт ішінде микробалдырлар мен цианобактерияларда Н₂ түзілудің негізгі молекулалық механизмдері зерттеле түсті. Фотосинтездің электрондық-транспорттық тізбегі, соның ішінде, судың ыдырау механизмі мен сутегі түзілуінің катализаторлары сияқты екі элементтен тұратын су биофототоллиз жүйелері концептуалды түрде тікелей биофототоллиз және жанама биофототоллиз ретінде қарастырылады. Белгілі болғандай, тікелей биофототоллиз үдерісі фотосинтетикалық пигменттер сіңірген жарық энергиясын пайдаланып, клетка құрамындағы судың оттегі (О₂) мен сутегі протондарына (Н⁺) ыдырауына қолданылады. Ал, тікелей биофототоллизге негізделген фотосинтез үдерісімен жүзеге асатын ферредоксин мен гидрогеназаны активтендіреді. Клетка жанама биофототоллизде көмірқышқыл газын түзу үшін судың бөлінуі және ферредоксиннің төмендеуі үдерістерін

пайдаланады, ал нәтижесінде алынған көміртегі қосындысын бөлек реакция кезінде сутектің бөлінуін ынталандыру үшін қолданады [26].

Фототорофты микроорганизмдердегі тікелей биофототоллиз үдерісі күн сәулесін энергия көзі ретінде қолданып, судың ыдырауын тудырып, соның негізіндегі бөлініп шыққан электрондар және протондар арқылы сутегі молекулаларын катализдеу қызметін атқарады.

Фотосинтез үдерісінің нәтижесінде пайда болған электрондар сутек ферменттері – гидрогеназа және нитрогеназа белсенділігін тудырып, соның нәтижесінде газ түріндегі Н₂ ортаға бөлініп шығады [27]. Анаэробты жағдай туындағанда немесе артық энергия жинақталған кезде фотосинтетикалық микроорганизмдер Н⁺-ды Н₂-ке айналдыратын ферменттерді қолданып артық энергияны қоршаған ортаға бөліп шығарады. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, судың бөліну реакциясы нәтижесінде пайда болатын электрондар мен протондар хлоропласттарда жинақталып, Н₂ түзуші ферменттер негізінде жоғары сапалы таза Н₂ (99,9% дейін) газына айналады [28-31].



Биосутек өндірісінің жүзеге асу механизмдері

Цианобактерия *Anabaena* түрлерінің барлығында хлорофилл а және басқа да пигменттер бар, олар күн сәулесінің энергиясын алу үшін және өсімдік тәрізді оттегілік фотосинтез жүргізу үшін фотосинтетикалық жүйелерді (ФЖ2 және ФЖ1) пайдаланады. ФЖ2 (Р680) пигменттері толқын ұзындығы 680 нм-ден қысқа фотондарды сіңіре отырып, суды протондарға (Н⁺), электронға (e⁻) және О₂-ге бөлуге қабілетті күшті тотықтырғышты ортаға бөліп шығарады. Фотосинтез нәтижесінде пайда болған энергия сызықтық электронды тасымалдаушылар мен цитохромдық кешен арқылы ФЖ1-ге беріледі. *Anabaena* штаммының барлығында ФЖ1 (Р700) пигменттері толқын ұзындығы 700 нм-ден төмен фотондарды сіңіреді, бұл тотыққан ферредоксин (Фд) және/немесе никотинамид адеиндинуклеотид фосфатын (НАДФ) төмендету үшін электрондардың энергия деңгейін жоғарылатады. Жасушалық мембранадан түзілген протон градиенті АУФ синтезі арқылы энергия өндірісін жүзеге асырады. Ал, гетероцисталы клеткаларда тек ФЖ1 болғандықтан, бұл комплекс О₂ бөліп шығара алмайды, бұл сутек бөлуші ферменттердің жұмысының

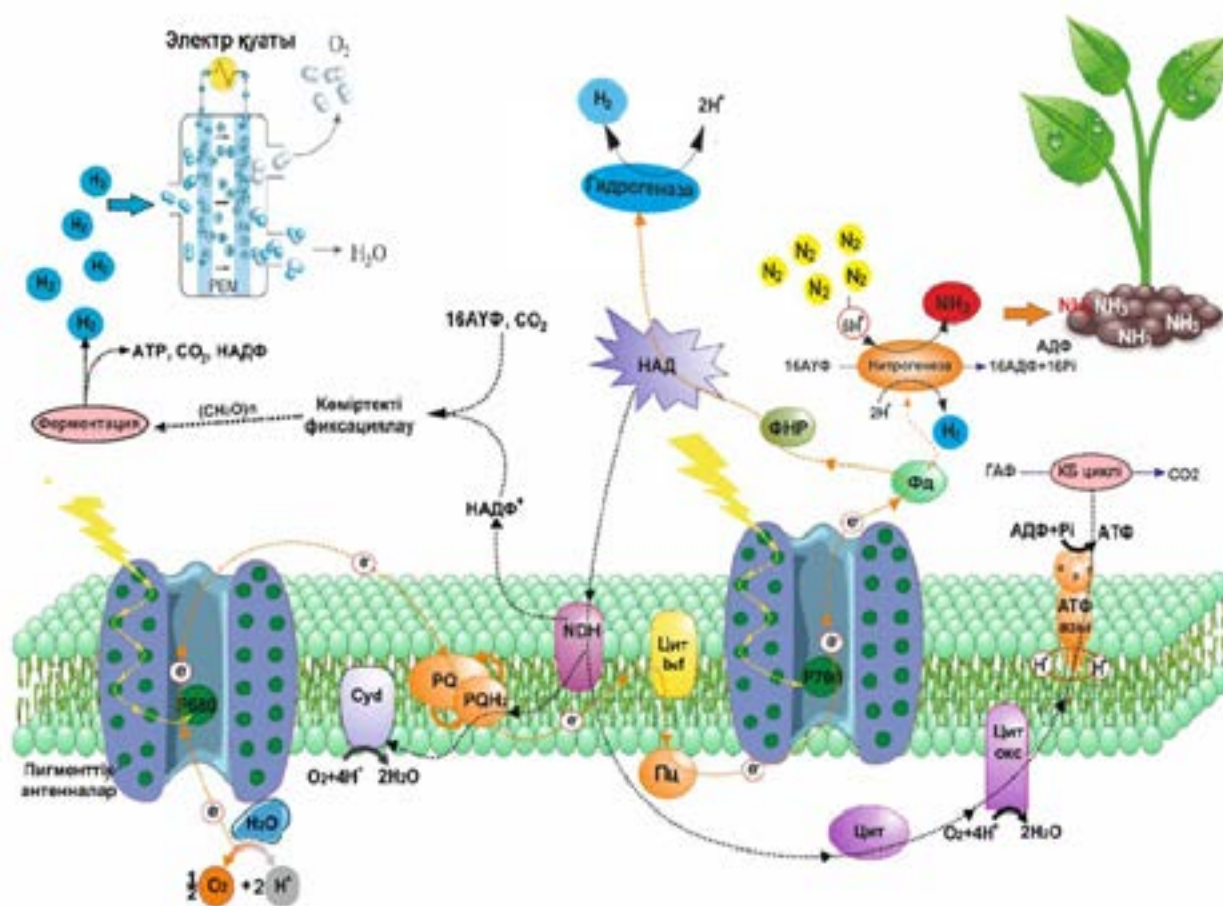
эффективтілігін тудырады. АТР және НАДФ көмегімен редукирті пентозофосфат жолы немесе жасушалардың өсуі үшін Калвин циклі арқылы азаяды. Үдерістерден артылып қалған энергия тотықсыздандырылған көмір жасушаларда көмірсулар (CH_2O) және липидтер түрінде сақталады [32].

Кей жағдайларда клеткалық ферредоксин белогі молекулалық сутектің ($2\text{H}^+ + 2\text{Fd} \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{Fd}$) эволюциясы үшін протондарды төмендету мақсатында гидрогеназа немесе нитрогеназа ферменттерін қатар қолданады. Негізінен, *Anabaena* штамдарында сутек бөлуге жауапты фермент «қайтымды гидрогеназа» болып табылады, себебі ол реакцияны екі бағытта да катализдей алады ($\text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2$). Осы тұрғыда *Anabaena* штаммымен көптеген жұмыстар келтірілген, мысалы, Benemann және Weege *Anabaena cylindrica* штаммы бірнеше сағат бойына аргон атмосферасында сутегі мен оттегі газының пайда болғанын хабарлады [25]. Со-

нымен қатар, Kossalbayev және т.б. екі бірдей *Anabaena* штаммының «қайтымды» гидрогеназа ферменті арқылы сутек бөлуін зерттеді [33]. Сонымен қатар, гетероцисталы клеткаларда орналасқан нитрогеназа ферменті де сутек бөлуіне жауап береді. Сутегі эволюциясына қатысатын бұл фермент бір уақытта ауадағы бос азоттың (N_2) аммиакқа (NH_3) тотықсыздануына жауап береді [34]. Дегенмен, гидрогеназа мен нитрогеназа ферменттері оттегі мен азотқа өте сезімтал болып келеді. Фотосинтез нәтижесінде пайда болған оттегі (O_2) клетка қабырғасын тесіп өтіп, сутек ферменттерінің белсенділігін азайтады/тоқтатады [35,36].

Цианобактериялардың биофотолізі 35 жылдан астам уақыт бойына белсенді зерттелуде [25-37] және нәтижесінде бірнеше әдістер жасалынды, соның ішінде тікелей биофотоліз және жанама биофотоліз айтуға болады (Кесте 2) [38].

Тікелей фотоліз процесіне негізделген H_2 өндірісі



1-сурет – *Anabaena* түрлерінің сутек бөлу механизмі

Anabaena түрлерінде тікелей биофотоллиз процесі Күн сәулесіне негізделген сутектің өндірісі үшін қолданылады. Жарық энергиясын ФЖ2, ФЖ1 пигменттері сіңіреді, бұл электрондардың ФЖ2 арқылы ферредоксинге PSI арқылы ауысқанда тотығудың энергия деңгейін жоғарылатады. Жарық энергиясының бір бөлігі сутегі газын сыртқы ортаға бөліп шығру үшін АУФ молекулалары түрінде қорға жиналады [39].

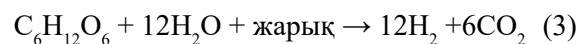
Anabaena түрлерінің табиғатта кең таралған морфологиялық және физиологиялық ерекшеліктері оларды сутек энергиясының перспективті объектілері етеді [40]. Нитрогеназа және/немесе екі бағытты гидрогеназа ферменттері түрлердегі вегетативті және гетероцисталы клеткаларда да пайда болады [41-42]. Сондықтан, *Anabaena* штаммдары сутегі зерттеулеріндегі азотты бекітетін перспективті цианобактериялар болып табылады. Бұл түрлердің негізгі функциялары ауадағы азотты топырақ құрамына беру, ал сутегі эволюциясы бұл процесте тек жанама өнім болып саналады. Көптеген келтірілген зерттеу жұмыстарына сәйкес, молекулалық азот болмаған кезде көбірек сутегі түзілуі мүмкін (формула 2). Сутегі эволюциясының негізгі энергетикалық көзі гетероцистада немесе вегетативті клеткаларда пайда болған көмірсудан (CH_2O) алынады [43]. *Anabaena* түрлерінде сутек өндірісіне жоғары тұрғыда энергия қажет болғандықтан (сутекке 4 АУФ), нитрогеназа ферменті негізіндегі H_2 энергиясының тиімділігі өте төмен (<1%) болып табылады [44].



Жанама фотоллиз процесіне негізделген H_2 өндірісі

Цианобактериялардың барлық түрлерінде фотосинтез барысында пайда болған энергия эндогенді көмірсулар түрінде клетка ішінде сақталады [45]. Ал, қорға жинақталған қосылыстар жарық жоқ кезде крахмал немесе гликоген түрінде сутек энергиясына қолданылады. Жарықтың тікелей қатысуынсыз жүзеге асатын үдеріс жанама фотоллизді құрайды. Алғашқылардың бірі болып Гаффрон мен Рубин сутек бөлінісінің механизмдерін зерттеп, нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерінің энергетикалық түзілуі клетка ішіндегі сумен тығыз байланысты екенін ашты [46]. Сонымен,

қатар, осы процестерге жасушаішілік көмірсулар да қатысатынын дәлелдеді. Қорда сақталған энергия ферментация негізінде көмірсулардың ашуы арқылы сыртқы ортаға шығарылып отырады. Ал артылып қалған энергия (тотықсыздандырушы күш) гидрогеназа ферментінің протондары ертінде сутек өндірісіне қатысады.



Жасыл микробалдырлармен салыстырғанда, бір клеткалы азот бекітетін цианобактериялар жанама биофотоллиз арқылы сутегі өндіруге көбірек қызығушылық тудырды. *Anabaena variabilis* азот шектеулі жағдайларда жоғары гликогенді (50 % құрғақ масса) жинақтайды және қараңғы және азоттық атмосферада индукциядан кейін 0,11 ммоль/г құрғақ а/сағ қалыпты молекулалық сутекті дамытады. Бір моль сутегі үшін жасушалар электронды қабылдағыш ретінде 1,4 моль ацетатты, 0,65 моль этанолды, 0,4 моль форматын және 0,1 моль лактатты шығарады [47].

Бұл процестің кемшіліктері нитрогеназаның аденозинтүшфосфат (АУФ) молекулаларына деген жоғары қажеттілігі. Сонымен қатар, бұл ауқымды процестерде үздіксіз жоғары жарық қарқындылығы қажет болып табылады [48-51].

1-кесте – Тура және жанама биофотоллиз процестерімен алынған сутегі өндірісін салыстыру

№	Үдеріс	Артықшылықтары	Кемшіліктері
1	Тікелей биофотоллиз	Күн энергиясын максималды тиімділікпен биоотынға айналдырады; Қарапайым технологияларды қолдану арқылы жүзеге асады; Метаболиздік әдістер арқылы жүзеге асады	Жарық жақсы өтетін фотобиореакторлар қажет; Сутегі/оттегі қосылыстарының ажырату қиындылығы бар; Гидрогеназа және нитрогеназа ферменттері оттегімен басылады
2	Жанама биофотоллиз	Оттегі мен сутегі оқшауланып бөлінеді; Сутегі өндірісі арзан фотобиореакторларда жүзеге асады.	Әрбір кезеңде аздап энергия жоғалады

Биосутек өндірісінде қолданылатын негізгі ферменттер

Anabaena түрлерінде азот фиксациясына және сутек өндірісіне қатысатын 2 түрлі фермент бар – N_2 аза және H_2 аза. N_2 аза ферменті гетероцисталы, ал H_2 аза ферменті тек вегетативті клеткаларда кездеседі. Нитрогеназа бір уақытта ауадағы бос азотты бойына сіңіре отырып, стрессті жағдайда қорға жинақталған энергияны сыртқа сутек түрінде бөледі. Сәйкесінше, бұл ферменттің жұмысы өте көп энергияны қажет етеді. Ал, H_2 аза ферменті вегетативті клеткаларда орналасып, анаэробты жағдайда қарқындылық танытып, сутек молекулаларын катализдейді.

Биосутек өндірісінің нитрогеназа ферменті

Нитрогеназа – цианобактерия *Anabaena* түрлерінде азот фиксациясына жауап беретін, көп салалы, мультисубстратты күрделі фермент. Нитрогеназа көптеген субстраттарды (протондарды қосқанда) қалпына келтіру үшін магний аденозин үшфосфатын (MgATP) және электрондарды қолданады [23].

Нитрогеназа тұрақты азоттың бір молекуласына бір сутегі молекуласын шығарады, ол үшін 8 электрон және 16 АУФ молекуласын қажет етеді. Анаэробты жағдайдағы

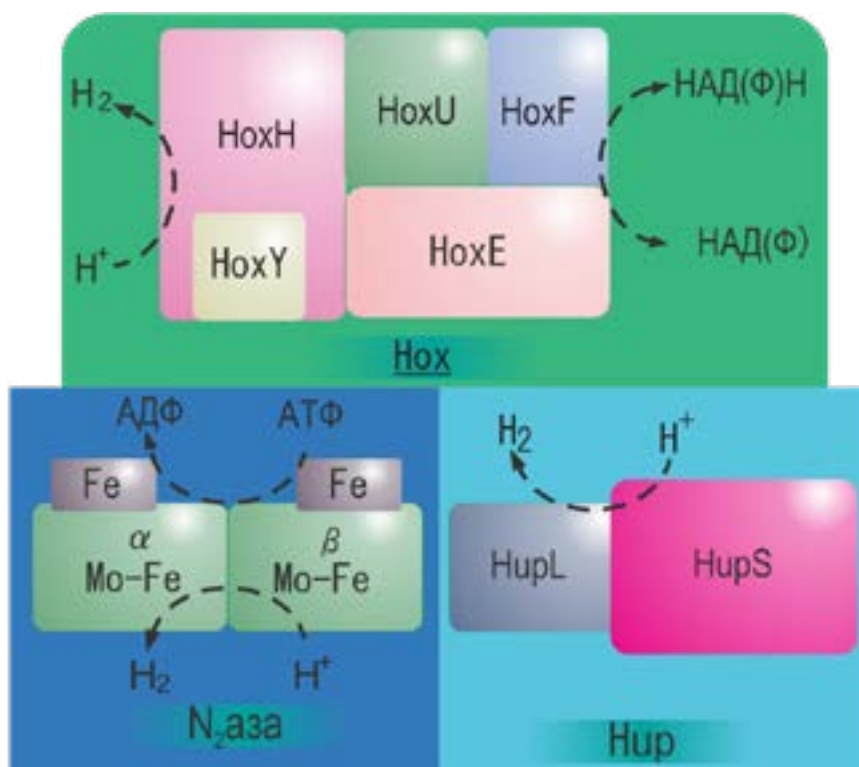
клетка энергияны барлық электрондарын босату үшін нитрогеназа арқылы сутекті бөліп шығарады, бұл оның сутекті цианобактериялармен шығарудағы маңызды рөлін анықтайды. Нитрогеназаның оттегінің әсеріне жоғары сезімталдығы кеңістікті бөлу (гетероцисталарда) және фотосинтез үдерістерін уақытша шығару сияқты бірқатар қорғаныс механизмдерімен бейтараптандырылған. Нитрогеназа құрылымы және оның сутек бөлу-дегі әртүрлі механизмдері туралы зерттеу жұмыстары соңғы жылдары қарқынды түрде зерттелді [52-54].

Anabaena түрлерінде ферменттің белсенді орталығындағы металлдың құрамына байланысты нитрогеназаның үш түрі бар:

1. Мо-нитрогеназа (Mo);
2. V-нитрогеназа (V);
3. Fe-нитрогеназа (Fe).

Осы түрлердің ішінде альтернативті нитрогеназа (Мо-нитрогеназа) ең көп зерттелген фермент болып табылады (3-сурет).

Нитрогеназа екі спецификалық ақуыз компонентінен тұрады: Мо-Fe протеині, субстратты



3-сурет – Сутегі алмасуына қатысатын цианобактериялық ферменттер [55].

қалпына келтіретін Р және Fe-MoCo кластерлері бар α , β кешендері және Мо-Fe ақуызына тән Ферредуктаза ақуызы. Сонымен қатар, сутегі өндірісі ауада азот болмаған кезде нитрогеназа арқылы синтездейтін АДФ гидролизін қажет етеді, Нур-гидрогеназа құрамында сутегі тотығуына арналған никель-темір компоненті бар, Нох-гидрогеназа жүйесі никельден де тұрады.

Ал, Мо-нитрогеназа – бұл азот атомдарын ыдырататын, сәйкесінше, 220-240 кДа молекулалық массасы бар $\alpha_2\beta_2$ гетеротетрамерінен тұратын құрылым. Динитрогеназа редуктазы шамамен 60-70 кДа гомодимері болып табылады және сыртқы электронды донордан (ферредоксин немесе флаводоксин) электрондарды динитрогеназаға ауыстыру кезінде аралық тасымалдаушы рөлін атқарады. Мо-нитрогеназа гетероцисттерде де, вегетативті жасушаларда да синтезделеді [56]. Нитрогеназа синтезі клеткадағы АУФ деңгейінде метаболизммен реттеледі және тотықсыздандырғыштың эндогендік пулының мөлшеріне тәуелді ферменттің белсенділігімен басқарылады [22,57,58].

Мо-нитрогеназадан басқа, цианобактерияларда ванадий және темірден нитрогеназаның белсенді орталықтары анықталды [59].

Цианобактериялық V-нитрогеназа алғаш рет *A. variabilis* штаммында анықталынып, толығымен сипатталды [60]. Цианобактерия клеткалары молибден жетіспеушілігі жағдайында және ортада ванадийдің қатысуымен ацетиленді этиленге дейін төмендетіп сутегін көп мөлшерде бөліп шығарды [61]. Сонымен қатар, ванадий нитрогеназасының құрылымдық гендері *A. variabilis*, *Nostoc punctiforme* штамдарында сипатталған [62]. V-нитрогеназаның V-Fe-ақуызының гетеродимері қосымша тағы 28 суббірліктен тұрады.

Fe-нитрогеназа деп аталатын оның белсенді орталығында Мо немесе V жоқ нитрогеназа түрі туралы ақпараттар өте аз. Ол негізінен азотобактер және күлгін бактериялардың кейбір түрлерінде кездеседі. Ал, цианобактериялардың ішінде тек *A. variabilis* клеткаларында белсенділік танытатыны анықталды. Fe-нитрогеназа арқылы клеткадағы сутегі бөлінуінің жылдамдығы молибден немесе ванадий нитрогеназаларына қарағанда шамалы төмен болып келуі мүмкін [62].

Биосутек өндірісінің гидрогеназа ферменті

Anabaena түрлерінде сутегі бөлуге қатысатын ферменттердің екінші тобы – гидрогеназалар. Бұл гетерогенді ферменттер тобы құрылымы, қасиеттері мен функциялары алуан түрлі болып

келеді. Фермент қарапайым химиялық реакцияны, яғни, протондар мен электрондардан сутек түзілуін катализдейді.

Қазіргі уақытта белгілі болғандай, барлық гидрогеназалар белсенді орталықтың құрылымы бойынша үш класқа бөлінеді [63-65]:

1) NiFe-гидрогеназа (никель темірінің гидрогеназалары);

2) FeFe-гидрогеназа (темір гидрогеназалары);

3) Fe-гидрогеназа («Металл емес» гидрогеназалар).

Көптеген фотосинтетикалық микроорганизмдерде, оның ішінде цианобактериялардағы гидрогеназалар екі топқа жіктеледі: 1 – тотығу гидрогеназалары (Нур), нитрогеназадан алынған сутегінің тұтынылуын катализдейді, 2 – сіңіру қабілеті бар қайтымды гидрогеназалар (Нох) [65].

Екі бағытты Нох-гидрогеназа темір-никельді гидрогеназаларға жатады және НохЕ, НохF, НохU, НохY және НохН ақуыздары қамтитын кешеннен тұрады. НохYН кешенінде НохН құрамында сутектің тотығуын катализдейтін каталитикалық орталық бар (сурет 3). НохY құрамында Fe_4S_4 кластері бар, ол электрондардың каталитикалық орталыққа өтуін жеңілдетеді. Электрондарды НохН ағымындағы белсенді орталық – НохY кіші бөлімі және НохEFU темір-күкірт кластерлері арқылы шығарады [66]. Бұл H_2 аза НАД(Ф)-пен тікелей әрекеттеседі, оны сутегі болған кезде азайтады немесе пиридин нуклеотидтерінің төмендеуі арқылы сутекті сыртқа шығарады. Нох-гидрогеназа цианобактериялардың көпшілігінде, морфологиясы мен азотты фиксациялау қабілетіне қарамастан анықталды. Әдебиеттерде бір клеткалы цианобактериялар – *Synechocystis* және жіпшелі *Anabaena* клеткаларында анықталғаны туралы көптеген деректер кездеседі. *Anabaena variabilis*, *Anabaena* PCC 7120, *Synechococcus* PCC6301 және *Synechocystis* PCC 6803 штамдарындағы H_2 аза ферменттері толығымен сипатталған [21,66-69]. Бірақ бұл ферменттің оттегіге сезімтал екенін және оның жұмыс істеуі үшін микроаэробты немесе анаэробты жағдайлардың қажет екенін атап өту керек [70].

Сонымен қатар, НурSL H_2 аза екі бөлімнен тұрады – үлкен НурL субуниті және кіші НурS суббөліктері, сәйкесінше, шамамен 60 кДа және 30 кДа (сурет 3). Үлкен қосалқы бөлікте белсенді орталық бар және биметаллды NiFe орталығымен қоршалған, ал кіші бөлімде электронды беруді қамтамасыз ететін темір-күкірт кластерлері

бар. Азот түзуші цианобактериялардың клеткаларында кездесетін HupSL гендері азотсыз ортадағы клетка жағдайында да көрінеді және нитрогеназа белсенділігімен тығыз байланысты болып келеді [71,72]. Сондықтан, HupSL гидрогеназасы экзогендік және нитрогеназамен бөлінетін сутекті сіңіру үшін гетероцисттердің ішінде синтезделеді. Оның қатысуымен гетероцистальық цианобактериялар азотты фиксациялау жағдайында ауаға сутекті шығармайды. *Nostoc punctiforme* клеткаларында нитрогеназамен тығыз байланыста болатын H_2 -аза ферментіне жауапты ақуыздар бар екендігі көрсетілген. Гетероцисттердегі мұндай реакция нитрогеназаға улы болып келетін оттегінің қысымының деңгейін төмендетуге көмектеседі, сонымен қатар, нитрогеназаны электрондармен қамтамасыз етеді [73-76]. Мысалы, *Anabaena variabilis*-те HupSL азоттың сарқылуы жағдайында NtcA цианобактериялық азотты реттегішпен әсер ету арқылы транскрипцияланады. Кейбір жағдайларда, HupSL комплексінің жоғары индукциясы сутегі болған кезде айқын байқалады [77].

Сутек өнімділігіне әсер ететін химиялық факторлар

Фотосинтез ингибиторлары. Сутегі өндірісіндегі цианобактериялық клеткалардың өнімділігін арттырудың тағы бір тиімді тәсілі – электрондарды тасымалдау ингибиторларын қолдану. Қазіргі уақытта 15-тен астам әр түрлі ингибиторлар қолданылады, олардың ішінде кеңінен қолданылатын диурон DCMU, СССР, метил виологен (МВ), калий цианиді (KCN), хлорамфеникол, 2,5-дибromo-3-метил-6-изопропил-р-бензокинон (DBMIB), пентахлорфенол (PCP) және малонат ФЖ ингибиторлары болып табылады (кесте 3).

Сонымен қатар, DCMU (диурон) – кеңінен қолданылатын электрон тасымалдау жүйесінің ингибиторларының бірі болып табылады, оның молекулалық құрылымы біртіндеп қысқарған пластокинонның құрылымына ұқсас және бұл молекулалардың ФЖ2 реакция аймағындағы хинон байланыстыру орталығында белсенді байланыстырылуымен түсіндіріледі. Диуронды қолдану фотожүйе 1 белсенділігін тежеуге және молекулалық сутек өндіруге қолайлы анаэробты жағдай жасауға бағытталған. Осылайша, DCMU ингибиторы хинонның аналогы ретінде QB ФЖ2-мен байланысады да, QA-дан электрондардың ауысуын тежейді (4-сурет). DCMU әсерінен цианобактериялық клеткалардағы сутегі өндірісінің артуы бірқатар

ғалымдардың жұмыстарында көрсетілген [37, 77-79]. Сournас және т.б. авторлар қараңғы, анаэробты жағдайда 75 ммоль DCMU қатысуымен *Synechocystis* sp. PCC 6803 клеткалары сутекті жоғарырақ өндіретінін хабарлады [80].

ФЖ ингибиторларының әсерінің негізгі нүктелері және цианобактериялардағы сутегі алмасуының белгілі бір жүйесінің жұмысын блоктау тәсілдері 7-суретте келтірілген. Зерттеу жұмыстары көрсеткендей, жоғарыдағы ингибиторларды қолдану цианобактерия клеткалары арқылы жүзеге асатын H_2 өндірісін ұлғайтады.

Цианобактерияларда фотожүйе 2-нің тағы бір танымал ингибиторы – карбонил цианид м-хлорофенил гидразоны (СССР) болып табылады. Бұл ингибитор DCMU сияқты, карбонилді цианид м-хлорофенил гидразин ФЖ2-нің фотохимиялық белсенділігін тежейді және O_2 өндірісінің төмендеуіне әкеледі. *Nostoc* sp. және *Lyngbya* sp. штамдарына СССР ингибиторымен әсер еткенде ФЖ2 фотохимиялық белсенділігі тежелетіндігі туралы хабарланды [81,82]. Сонымен қатар, *Oscillatoria chalybea* мен *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамдарына СССР тежегішімен әсер еткенде H_2 өндірісінің жоғарылағаны туралы зерттеу нәтижелері бар. Сондай-ақ, СССР ингибиторының АТФ синтезін тежеуі туралы деректер көптеген ғалымдардың жұмыстарында келтірілген және *Anabaena variabilis* және *Anacystis nidulans* дақылдарының қараңғы ортадағы тыныс алу жылдамдығының жоғарылауына алып келді [81,82,84].

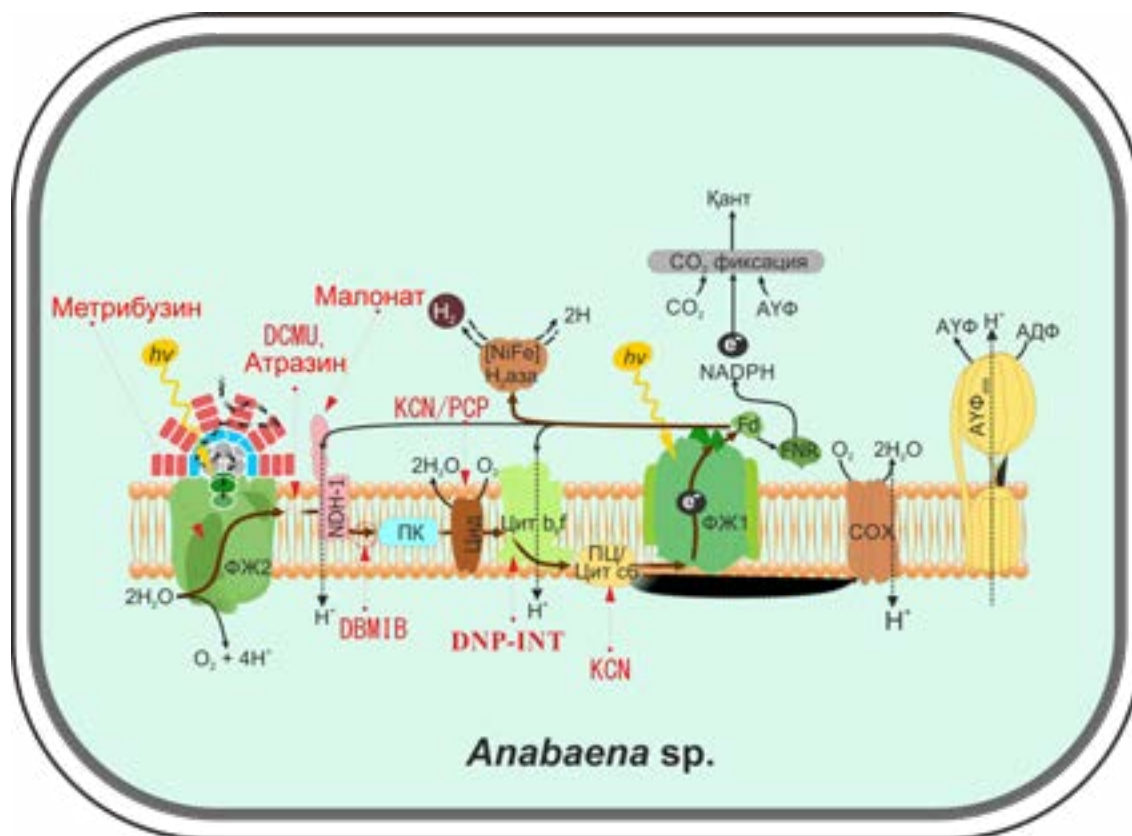
KCN және PCP сияқты ингибиторлар хинол оксидазаны блоктайды, бұл PQ пулының азаюын тудыруы. Сонымен қатар, KCN ингибиторы сутек бөлінуді блоктайды немесе DBMIB-ге сияқты Берг және Кругман [84] ұсынған жұмыста Сут b_6f комплексінен фотожүйе бірге дейін толығымен электрон транспортын блоктайды. Сонымен қатар, DBMIB нитраттың ассимиляциялық гендерінің реттелуіне ықпал ететіні көрсетілген [85] және нитраттың ассимиляциясының тежелуі өз кезегінде H_2 өндірісінің артуына алып келді [86].

Цианобактерия клеткалары арқылы сутек өндірісінің өнімділігін жоғарылатудың тиімді метаболиттік тәсілінің бірі – ортаға әр түрлі экзогенді электрон донорларын қосу болып табылады. Көміртектің көзі нитрогеназа ферментінің белсенділігіне әсер ететіні белгілі. Қарапайым органикалық қосылыстар болған кезде сутегі өндірісі артады, өйткені, кофактор қосылыстары арқылы электронды тарту нитрогеназаның

қызметін белсендіреді. Сонымен, әртүрлі қанттардың қосылысы да сутегі өндірісін ынталандырды, ал маннозаны қосқанда салыстырмалы

түрде ең жоғары көрсеткіш байқалды [87].

Субстраттар. *Anabaena* цианобактериялары гетеротрофты метаболизм арқылы эндогенді



4 сурет – Цианобактерия фотосинтез ингибиторларының әсер ету механизмдері

де, экзогенді де субстрат көмегімен H₂ түзе алады [88]. Эндогендікке келетін болсақ, ең маңыздысы – крахмал, ол процестің жарың көзі бар кезеңінде түзіледі және одан әрі H₂ өндірісіне электрон беру үшін жұмсалады [89]. Барлық қол жетімді крахмал тұтынылғаннан кейін, жасушаны жарық пен қоректік заттардың көмегімен регенерациялау керек, ол ФЖ2-ні қайта жандандырады және биомассаның өсуінің жаңа циклін бастайды [90,91]. Сутегінің жиналуын N, S қоректік ортадан алып тастау және жарықтың жоғары қарқындылығы немесе CO₂-нің жоғары концентрациясымен реттеуге болады. Гетеротрофты және миксотрофты тұрғыда өсетіндер үшін липидтер сияқты басқа эндогенді субстраттарды, тұздың жоғары концентрациялы ортасы және темірдің жоғары концентрациясы арқылы көбейтуге болады [91].

Таза органикалық субстраттарды қолданудың екі үлкен кемшілігі бар: гетеро-

трофты микроорганизмдермен тез ластануы және көзді алудың қымбат бағасы [92-94]. Соңғы зерттеулер органикалық қышқылға бай қараңғы ортада ферменттеу ағынының фотогетеротрофты деградациясын орындау үшін цианобактерияларды қолдану мүмкіндігін зерттейді, өйткені клеткалар өсімдікте және бактерияларда түзілетін органикалық қышқылдардан қоректенеді, O₂ ортасының төмен деңгейін сақтай алады [95]. Органикалық қалдықтарды пайдалану қол жетімділікті, бағаны, көмірсулар мен биологиялық ыдырауды ескере отырып айтылады, бұл ауыл шаруашылығы қалдықтарына қосымша құн беру және CO₂ шығарындыларын азайту сияқты артықшылықтарға ие [96]. Ақыр соңында, көміртегі жоғары өнеркәсіптік ағынды суларды қолдану туралы айтылады, олар-сүт өндіру, зәйтүн диірмені, наубайшы ашытқысы мен сыра қайнату суларынан алынатын, H₂ өндірісін арттыратын арзан ресурс көздері бо-

лып табылады.

Кобальт (Co), мыс (Cu), молибден (Mo), мырыш (Zn) және никель (Ni) сияқты микро-элементтер сутегі өндірісіне әсер етеді [97]. Бұл металдардың көпшілігі сутегі өндірісінің айқын жоғарылауын көрсетті және олардың нитрогеназа ферментіне қатысуына байланысты деп есептеледі. Мысалы, *Anabaena variabilis* SPU003 Co, Cu, Mn, Zn, Ni, Fe иондарына өте сезімтал және осы иондар үшін 10 мМ-ден төмен концентрацияда сутегі өндірісін байқалмады [98]. *Anabaena cylindrica* дақыл литріне 5,0 мг темір ионымен жақсы өседі, бір литрге 0,5 мг темір иондары бар дақылға қарағанда екі есе жылдам сутегі шығарады [98].

Көміртек көздері нитрогеназа белсенділігіне әсер ету арқылы сутегі өндірісіне де әсер ететіні белгілі [99]. Көміртектің әр түрлі көздерінің болуы электрон факторларының нитрогеназаға қосылу қабілетінің өзгеруіне әкеледі, осылайша сутегі өндірісіне әсер етеді [100]. Көміртегі көзі ретінде көбіне зерттеу жұмыстарында NaHCO_3 тұзы қолданылады. Kossalbayev және т.б. жұмыстарында 100 мкм сода концентрациясы сутек бөлуіне оңтайлы болғаны жайында хабарлады [33]. Ал, Zayadan және т.б. жұмыстарында 50-100 мкм сода концентрациясында азотфиксациялау штаммдар жоғары қарқынмен сутек бөлді [101].

Бірнеше бейорганикалық азотты қосылыстар сутектің өндірілу жылдамдығына көп жағынан әсер етеді. Нитрит, нитрат және аммиак *Anabaena variabilis* SPU003 және *Anabaena cylindrica* түрінде нитрогеназаны тежейтіні туралы хабарланды [77,99]. Әдетте экзогенді түрде қосылған барлық азот көздері нитрогеназа синтезін тежейді [100,103]. *Anabaena cylindrica* аммонийдің қосылуы ($0,2 \text{ mM NH}_4^+$) белгілі бір уақытта сутегі өндірісін басады, бірақ мерзімді түрде аз мөлшерде қосу ($0,1 \text{ mM}$ аммоний хлориді) сутегі эволюциясын тежемейді. Алайда, азот көзінің әсері әрқашан жоғары әсер. Сутегі мен оттегінің өндірілу коэффициенті (4:1) толық азотсыз жағдайда аммоний иондарын қосқанда төмендейді [37].

Сутек өндірісіне әсер ететін физикалық факторлар

Жарық – цианобактериялардың өсуінде маңызды рөл атқаратын фактор болып табылады. Цианобактериялардың көпшілігі қызыл жарықты 680 нм-ге жақын сіңіретініне қарамастан, цианобактериялардың әр түріне сутегінің өндірілуіне қажеттілік әр түрлі болады. Сутегі бөліну барысында жарық интенсивтілігі

клеткалардағы сутек ферменттерінің қызметіне тікелей әсер етеді [104,105].

Vargas және т.б. *Anabaena* sp. UTEX 1448 штаммының сутек бөлуге оңтайлы жарық көрсеткіші 2220 люкс екендігін тіркесе [104], Nyberg және т.б. қолдан жасалған фотобиореакторда $\Delta hupW$ *Nostoc* PCC 7120 өсіріп, сутегі бөлінуіне ең оптимальді мөлшерді зерттеп, $315 \text{ мкмоль м}^2/\text{сек}$ жарық берілуінде жоғары H_2 бөлінетінін айтты. *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *hupL* мутант штаммы $0.6\% \text{ } 2.9 \text{ W м}^{-2}$ жарық интенсивтілігінде қарқынды өсіп, сутек жоғары бөлді [106]. Ал, Jeffries және т.б. зерттеуі бойынша *Anabaena cylindrica* штаммының сутек бөлуіне 32 W/м^2 жарық қарқындылығы қолайлы болды [107].

Сонымен қатар, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 жабайы штаммы мен оның PK84 мутанты сутек бөлу үшін зерттелініп, қараңғы ортаға қарағанда жарықта белсенді H_2 бөлетіні анықталды [108]. Осыған ұқсас жұмыстар Shah және т.б. жүргізді. Олар *Nostoc muscorum* штаммының нитрогеназа белсенділігі тікелей жарықтың интенсивтілігіне тәуелді екендігін хабарлады [109]. *Anabaena* штамдарының бірнеше түрлерінің жарыққа тәуелділігі зерттелінді, *Anabaena cylindrica* штамы сутегінің аргон атмосферасында 30 күн жарық шектеулі (жарық қарқындылығы $6,0 \text{ Вт/м}^2$) және 18 күн жоғары жарықта (жарық қарқындылығы 32 Вт/м^2) шығарады [110]. Сонымен қатар, жарықтың төмен интенсивтілігі кейбір цианобактерия түрлеріне оң әсер ететіндігі туралы ақпараттар бар. Мысалы, *Anabaena cylindrica* штаммының сутек бөлуіне азайтылған жарық мөлшері азот көзінің аз пайда болуына алып келеді. Соның нәтижесінде сутек ферменттерінің белсенділігі артатынын зерттеді. Цианобактериялардың көпшілігінің нитрогеназалық сутегі өндірісіне жарықтың әсері жақсы зерттелген [110]. Hallenbeck және т.б. өз зерттеулерінде цианобактерия штамдарының сутек бөлуіне оңтайлы жарық $20\text{-}60 \text{ W/м}^2$ арасы екендігін айтты [110].

Anabaena түрлері көптеген экожүйелер мен жағдайларда кездеседі; олар әдетте 4-7 рН диапазонында өседі [165,170], және кейбір түрлері теңіздің терең аймақтарында тіршілік етеді [170]. H_2 -ге қатысты рН маңызды параметр болып табылады, тіпті ортадағы кішігірім өзгерістер биомассаның өсуіне де, био- H_2 эволюциясымен байланысты метаболизм жолдарына да әсер етеді, ол H_2 өндіретін ферменттердің белсенділігін бақылайды және эндогенді субстраттың ыдырауына кедергі жасайды [30,170,179].

Фотосинтез кезінде CO_2 мен судың реакциясынан кейін пайда болатын көмір қышқылының әсерінен бастапқы рН төмендейді, процесс жүріп жатқанда, клеткалар еріген CO_2 мен қосалқы өнімдер түзілгенде ортада рН жоғарылайды [111,112]. рН төмен мәндерінде H_2 гидрогеназа пируват Фд-оксидоредуктаза жолымен түзіледі, алайда [FeFe]-гидрогеназаның тежелуіне байланысты ацетат пен АТФ H_2 үстінде түзіледі. Vargas және т.б. 2018 *Anabaena* sp. UTEX 1448 штаммының сутек бөлуге оңтайлы рН көрсеткіші 8,2 екендігін хабарлады [104]. Ал, Jeffries және т.б. *Anabaena cylindrical* штаммының сутек сутек бөлуіне жарық және рН көрсеткіштерінің әсерін зерттеу жұмыстарын жүргізіп, ең оптималды рН көрсеткіші 7.4-9.4 аралығында болғанын жазды [107].

Гетероциста түзуші цианобактерия түрлері қоршаған ортаның барлық эко-жүйелерінде табылған. Оған себеп олардың орта жағдайына бейімделгіштігі болып табылады. Мысалы, *Anabaena* sp., *Anabaena variabilis*, *Oscillatoria* Kutz, түрлері шөлді аймақтардағы өсімдіктердің сабақтарынан табылды [113] және осы табылған штаммдардағы сутек бөлу және клеткаларды өсіру температуралары бір-біріне жақын болды.

Цианобактерия *Anabaena* клеткаларының сутек бөлу үшін қолайлы температурасы 22-35°C болып табылады. Дегенмен, ол түрлердің тіршілік ету ортасындағы қоршаған орта жағдайына байланысты әр түрлі болып келеді. Мысалы *Nostoc (Anabaena)* штаммы 22°C температурада 32°C [114] температураға қарағанда жоғары H_2 бөле алады, осы жағдайда *Nostoc muscorum* SPU004 штаммының сутекті жоғары бөлу температурасы 40°C екені анықталды. Айта кету керек, *Anabaena variabilis* SPU 003 штаммының өсуіне және H_2 бөлуіне қолайлы температура 30°C құрады [115]. Vargas және т.б. *Anabaena* sp. UTEX 1448 штаммының сутек бөлуге оңтайлы өсу температурасы 24°C екендігін хабарласа [104], ал Nyberg және т.б. зерттеулерінде *Nostoc (Anabaena)* PCC 7120 штаммы 30°C температурада жоғары мөлшерде H_2 бөлді (4.85 мл H_2 /сағ) [106].

Биосутек өндірісінің генетикалық бағыттары

Генетикалық манипуляциялау әдістері жақында *Anabaena* түрлерінде H_2 өндірісін жақсарту үшін қолданылды, ол (1) хлорофилл антенналарының азаюын, (2) фотосинтез мен тыныс алудың жоғары жылдамдығын, (3) аэробты фазада көмірсулардың жоғарылауын, (4) ФЖ2 инактивациясынан қорғайтын ксанто-

филл циклі пигменттерінің жоғары синтезімен тікелей байланысты болды. Пигментацияның айырмашылығы, жасушадағы антеннаның құрамы, әсерінен болатын жоғалтулар, шашырау, фотосинтетикалық белсенді сәулелену аймағынан тыс сәулелену, фотохимиялық емес реакциялар және сыртқы ортаның басқа факторлары сияқты жарық эффектілері күн мен H_2 конверсиясының тиімділігіне әсер етуі мүмкін. Хлорофилл аз мутантты микробалдырлар биореактордың терең қабатына көбірек жарық түсіру арқылы кең ауқымды коммерциялық қосымшаларды жақсарту үшін басқарылуы мүмкін. Гендік инженерия – бұл цианобактериялардың H_2 өндірісін жаңа деңгейге көтерудің қуатты құралы, дегенмен кең көлемді талдау кезінде дәйекті нәтиже алу үшін қосымша теориялық білім алу қажет болып табылады.

Anabaena sp. PCC 7120 геномының барлық тізбегі қазіргі таңда қол жетімді. Гетероцистаның геномдық экспрессиялық зерттеулері гетероцистаның дамуы кезінде жоғары және төмен реттелетін көптеген гендерімен тығыз байланысты болып келеді. Гетероцисталарды дифференциалауға және үлгілеуге бірнеше гендер қатысады және олардың кейбіреулерінің мутациясы гетероцисттердің жиілігін жоғарылататынын көрсетті [114]. Гетероцисттердің көп болуы H_2 түзілуінің жылдамдығы мен N_2 фиксациясын жоғарылатуы мүмкін, сондықтан гетероцисттердің H_2 өндірісіне әсерін зерттеу маңыздылық танытады.

Anabaena штаммдарының түрлерінің көпшілігінде Нур гендері, ал кейбірінде Нох гендері бар. Атап айтқанда, Нур белсенділігінің болуы осы организмдерге негізделген N_2 аза негізіндегі H_2 ауқымды өндірісін дамытуға үлкен кедергі болып саналады. Химиялық мутагенез немесе гендік инженерия арқылы алынған Нур жетіспеушілігі бар мутанттардың H_2 сіңіру белсенділігі болмады, демек фотобиологиялық H_2 өндіру белсенділігін көрсетті. N_2 аза сутектің бір бағытты эволюциясын катализдейтіндіктен, *Nostoc* sp. штаммының Нур мутантты жасушалары эволюцияланған жағдайында бірнеше күн ішінде H_2 концентрациясын виал ішінде 29%-ға дейін жинай алды [111].

Фотосинтетикалық организмдерде H_2 өндірісін жақсартудың балама әдісі – бұл H_2 тиімді өндіру қабілеті жоғарылаған мутанттарға жүйелі генетикалық сұрыптау жүргізу. Гендік инженерия цианобактерияларда H_2 өндірісін ұлғайтудың маңыздылығын көрсетті. Сонымен қатар, *Anabaena* клеткаларын гендік манипу-

ляциялау арқылы оттегіне төзімді немесе, кем дегенде, қайтымды түрде инактивтелген клеткалар қылуға болады. H_2 өндірісінің ең болашағы мол жүйесі қандай организмдер екенін анықтау қиын. Сондықтан, цианобактериялардағы O_2 сезімталдығын төмендету стратегиясын жасау маңызды. Мысалы, O_2 инактивациясына төзімді цианобактерия [FeFe]-гидрогеназаны құрастыруға немесе фотосинтетикалық цианобактериалды жасушаларға төзімділігі жоғарылаған [NiFe]-гидрогеназаны кодтайтын генді енгізуге болады.

Цианобактериялар мен басқа жасушалық дақылдарды қолдануға негізделген H_2 фотопродукция процестері салыстырмалы түрде төмен түрлендіру тиімділігін көрсетті. Сонымен қатар, H_2 жоғалуын азайту үшін антенна өлшемі кішірейтілген мутанттармен H_2 түзілуін жақсартуға болады және флуоресценция және H^+ мен электронды ұяларды H_2 шығаратын сәйкес ферменттерге тиімді қайта бағыттау.

Биосутек өндірісінде қолданылатын Anabaena белсенді штамдары

Көптеген цианобактерия штамдары сутекті қараңғы және жарық ортада бөлуге бейімделген, ол өз кезегінде түрлерде кездесетін гендердің белсенділігімен тікелей байланысты болып келеді. Сонымен қатар, *Anabaena* дақылды анаэробия және қараңғы жағдайда, $30^\circ C$ температурада қарқынды түрде сутек бөлді [1000]. *Anabaena cylindrica* IAMM-1 штамымен сутегі бөлінісі қараңғы ортадағы анаэробты жағдайда байқалды. Температура мен рН көрсеткіштерін оңтайландыру ферментативті реакцияларды реттеу арқылы метаболизмді бақылай отырып, цианобактериялардың сутегіні катализдеу қабілетін арттыруда маңызды рөл атқарады. Жарияланған мәліметтерге сәйкес, цианобактериялардың түрлерінде сутек бөлуге температуралық айырмашылықтары бар [114].

Сондай-ақ, сутек катализдеуші ферменттердің белсенділігіне қоректік орта құрамындағы көміртек көзі мен элементтердің де тигізетін әсері бар. Сонымен қатар, қарапайым органикалық қосылыстардың әсерінен сутегі өндірісі арта түсетіні белгілі, өйткені, кофактор қосылыстары арқылы электрондардың айналымын жылдамдату жұмыстары нитрогеназаның белсенділігін арттырады. Түрлі қанттардың қоректік ортаға қосылуы сутегі өндірісін ынталандыра алады, мысалы, маннозаны қолдану сутегі мөлшерін сағатына бір мг құрғақ биомасса мөлшерінде 5,58 нмоль сутекке дейін арттырды.

Фототрофты микроорганизмдердің клеткалары арқылы әртүрлі микроэлементтердің әсеріне байланысты биосутекті өндіруде көптеген әдеби қайшылықтар бар. Дегенмен, Fe, Cu, Co, Mo, Zn және Ni сияқты әртүрлі микроэлементтердің қоректік ортаға қосылуына сутегі өндірісін едәуір арттыратыны белгілі болды. Алайда, Ni^{2+} аз концентрациясының H_2 өндірісіне *Anabaena* spp. СА және *Anabaena* spp. 1F штамдарының клеткаларына теріс әсер ететіндігі Zhang және т.б. зерттеу жұмыстарында байқалды [115].

Сонымен, цианобактериялардың клеткаларымен сутектің катализденуіне әсер ететін көптеген факторлар бар, оларды реттеу және өзгерту арқылы үлкен оң нәтижелерге қол жеткізуге болады. Осы тұрғыда, сутек бөліну көрсеткішін арттыруда цианобактерия штамдарының биомассасы маңызды рөлге ие болуы мүмкін. Себебі, клеткалардың қарқынды өсу жылдамдығы көп мөлшерде сутек алуға мүмкіндік береді. Соңғы 50 жыл бойына көптеген цианобактерия штамдарымен жүргізілген зерттеу жұмыстары осыған дәлел болады. Сутегі өндірісінің тиімділігі микроорганизмдердің метаболиттік потенциалына байланысты және бұл өз кезегінде цианобактериялардың активті сутек бөлетін штамдарын табу жұмыстарының маңызды екендігін көрсетеді. Бүгінгі таңда әртүрлі дақылдау жағдайында сутекті өндіретін 14-тен астам цианобактериялардың классы белгілі. 2-кестеде сутекті шығару қабілетімен ерекшеленген цианобактериялардың белсенді штамдары келтірілген.

Негізінен, азотты бекітпейтін цианобактериялардың фотожүйелерінде H_2 өндірісі нитрогеназа жүйесі барлармен салыстырғанда төменірек болып келеді. *Anabaena* сияқты гетероцисталы цианобактерияларда вегетативті жасушалардан пайда болған O_2 эволюциясы нитрогеназа жүйесін бұзбайды және жарық кезінде H_2 түзе алатын организмдер болып табылады. Жарықта *Anabaena* көмірқышқыл газын полисахаридке сақтайды және O_2 түзеді. Аксоникалық қараңғы жағдайларда нитрогеназа түзіледі, азот фиксациясы мен H_2 эволюциясы үшін электрондарды қамтамасыз ету үшін полисахаридті сақтау катаболизденеді. Көптеген цианобактериялардың H_2 түзетіні туралы хабарланғанымен, солардың ішінде ең кең зерттелгені *Anabaena* түрлері болып табылады.

2-кесте – Сутектік белсенді бөлетін цианобактерия штамдары

Штамм атауы	Штамм сипаттамасы	H ₂ мөлшері	Әдебиеттер
<i>Anabaena azollae</i>	Жабайы	38,5 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[47]
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Жабайы	45,16 ммоль H ₂ /мг хл а/сағ	[47]
<i>Anabaena variabilis</i> PK17R	Жабайы	6.32 нкмоль H ₂ /мг прот/сағ	[47]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Жабайы	167,6 ммоль H ₂ /мг хл а/сағ	[47]
<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-13	Жабайы	0,31 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[13]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Жабайы	20 μmol/mgChl a/h	24
<i>Anabaena variabilis</i> ATTC 29413	Жабайы	34.5 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[71]
<i>Anabaena azotica</i> FACHB-118	Жабайы	24 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[71]
<i>Anabaena variabilis</i>	Жабайы	9 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[71]
<i>Anabaena variabilis</i>	Жабайы	40 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[71]
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>hupL/hoxL</i> -мутанты	53 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[13]
<i>Anabaena variabilis</i>	Иммобилизацияланған жасушалар	0.6 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[109]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Гидрогеназа мутанты	260 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[24]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Гидрогеназа жоқ	19 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[94]
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Жабайы	0.9 л H ₂ /кг биомасса/сағ	[15]
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012	<i>hupS</i>	30 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[45]
<i>Anabaena</i> PCC 7120	$\Delta hupL$	60 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[10]
<i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120	$\Delta hupL$	35 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[10]
<i>Anabaena</i> PCC 7120	Жабайы	50 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[72]
<i>Anabaena</i> AMC 414	Жабайы	60 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Мутант	20 мл H ₂ /л/сағ	[94]
<i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120	ΔHup	29 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[13]
<i>Anabaena variabilis</i> SPU 003	Жабайы	3.15 нмоль H ₂ /мг биомасса/сағ	[109]
<i>Nostoc punctiforme</i> strain NHM5	$\Delta hupL$	14 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[65]
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	$\Delta hupW$	3.3 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[65]
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413 AVM13	Δhup	135 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[71]
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	ΔHup	63 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[77]
<i>Anabaena</i> PCC 7120	$\Delta hupW$	6.2 мл H ₂ /л/сағ	[106]
<i>Anabaena</i> sp. (UTEX 1448)	Жабайы	67.07 мкмоль H ₂ /л/сағ	[104]

Нитрогеназа ферментіне негізделген гетероцисталы *Anabaena* штамдары бастапқы 2-3 тәулікте активті түрде молекулалық H₂-ні бөліп, тез арада клеткадағы қорға жиналған энергияны пайдаланады. Ал гетероцистасыз түрлер (*Synechocystis*, *Synechococcus* және т.б.) гидрогеназа ферментінің белсенділігін бір аптадай

тұрақты ұстай алады. Себебі, бұл қасиеттер екі сутектік ферменттің энергияны тұтыну ерекшеліктеріне тікелей байланысты жүзеге асады. Қазіргі таңда сутек өндіру мақсатында көптеген штамдардың генетикалық және метаболиттік қасиеттері зерттелінді. Олардың ішінде белсенділігі жоғары кейбір түрлерін

атап өтсек. Азот фиксациясына қатысатын цианобактериялардың *Anabaena* түрлері сутегі белсенділігіне қатысты жағы салыстырмалы тұрғыда жақсы зерттелген. Сонымен, *Anabaena cylindrica*, шектеулі жарық жағдайында, 30 тәулік ішінде, аргон атмосферасында сутегі мен оттегін қатар шығара алатыны тіркелді. *Anabaena* sp. көп мөлшерде сутек шығаруға қабілетті, ал *Anabaena cylindrica* азот жетіспеушілігі жағдайында сутектің ең жоғары мөлшерін өндірді (30 мл/л дақыл/сағ) және т.б. [71].

Осы уақытқа дейін жүргізілген зерттеулер *Anabaena* AVM13 (DhupSL) [71], *Nostoc punctiforme* NHM5 (DhupL) [65], *Anabaena* PCC 7120 (DhupL/DhoxH, DhupW) [65] штамдарының барлығы жабайы түрлерімен салыстырғанда айтарлықтай жоғары жылдамдықпен сутегі өндіру қабілетіне ие екендігін көрсетті (2-кесте).

Молекулалық оттегі гидрогеназа мен нитрогеназа ферменттерінің белсенділігін тежейтіні белгілі. Сондықтан, ФЖ2 комплексі арқылы жүзеге асатын H_2O тотығуының жанама өнімі ретінде түзілген оттегінің ортаға шығарылуына және жарыққа тәуелді сутегі өндірісі үшін жауап беретін гендерді зерттеудің маңызы зор. Осы тұрғыда, генетикалық зерттеулерден басқа сутегі өндірісіндегі цианобактериялардың өнімділігін жоғарылатудың метаболиттік тәсілдерінің негізгі үдерістері ФЖ2 ингибирлеуге бағытталған, және ол оттегі жоқ орта құру және сол арқылы нитрогеназа белсенділігін арттыруға негізделген әдістер жүйесінен тұрады.

Осы тұрғыда, GX флокондарының ішінде цианобактерия клеткаларының сутек ферменттерінің белсенділігін тудыру мақсатында инертті газдарды енгізуден соң *Anabaena variabilis* цианобактерия штамы сутектің жоғары мөлшерін өндірді [24]. Аргонды қолдану нитрогеназа белсенділігінің жоғарылауына және цианобактериялардағы гетероцисталардың санының артуына алып келді. Себебі, ауадағы және қоректік ортадағы азоттың жетіспеушілігі клеткалардың стресстік жағдайын туғыза отырып, гетероцисталардың санын арттырады. Ал гетероцисталар ауадағы азотты сіңіру мақсатында нитрогеназа ферментін активтендіреді, ал нитрогеназа ферменті азотты сіңіру үдерісімен қатар, сутекті бөлу қызметін де қатар атқарады. *A. variabilis* PK 84 дақылы биомассаны жинау үшін өсіргенде 73% аргон, 25% N және 2% CO_2 , ал сутек алу процедурасында 93% аргон, 5% N және 2% CO_2 ара-қатынасындағы газдардың

қоспасымен аэрацияланғанда 167,6 мкмоль/мг хл а/сағ мөлшеріндегі жоғары сутегі өндірісін көрсетті [65].

Биосутек өндірісінің болашағы

Anabaena штамдары негізінде сутек алу жұмыстарында тек зертханалық нәтижелер туралы хабарланды, бірақ зауыттық пилоттық деректер әдебиетте кездеспейді. Себебі, келесідей негізгі мәселер әлі шешімін таппаған: жарық ортасы, климат және жер кеңістігі, реакторлық құрылыс материалдары, дақылды араластыру механизмі.

Зертханалық масштабта био- H_2 өндірісі тез арада жақсарды және перспективалы нәтиже көрсетті, бірақ нақты қосымшаларды алу үшін дұрыс оңтайландыру және масштабтау үшін ғылыми білімдерді өндірістік қажеттіліктермен дұрыс байланыстыру қажет. Химиялық процестермен алынған H_2 -ге қарағанда, био- H_2 өндірісінде үлкен қиындықтары бар, мысалы: өсіру процесінде монокультураны сақтау, өнімділіктің төмендігі мен энергияның айналу тиімділігі, O_2 тежелуі, цианобактериялардың сыртқы факторларға сезімталдығы, тұрақты газ генерациясы, сәйкес фотореакторлық жүйенің дизайны (жарық, араластыру, температура, бақылау құрылғыларын, мөлшерін, H_2 -ті ұстау және жою, күрделі шығындарды ескере отырып), флокуляция, жинау техникасы, газ тазарту әдістері, сақтау, тасымалдау үшін барабар жүйелер, жеткізу, коммерцияландыру, процестерді басқару, шығындар мен сенімділік үшін нақты белгіленген өндіріс технологиясының болмауы.

Барлық авторлар жоғарыда аталған техникалық, әлеуметтік және саяси кедергілерді ескере отырып, соңғы өнімнің бағасы басқа коммерциялық жанармайға қарағанда, экономикалық тұрғыдан тиімсіз екендігін айтты. Сол себептен, арзан фотобиореакторларды жобалауға және фотосинтетиканы оңтайландыруға бағыттау қажет деп келіседі.

Қорытынды

Сутегі газы болашақтағы энергия тасымалдаушы ретінде қарастырылады, себебі ол жану кезінде «парниктік газ» CO_2 газын сыртқы ортаға бөліп шығармайды, электр энергиясына оңай айналады және таусылмайтын ресурс болып табылады. Сутегі биологиялық өндірісінің кәдімгі сутегі өндіру процестерінен бірнеше артықшылығы бар. Бұл мөлдір жабық ортадағы

қарапайым фотобиореакторды қолдануды талап етеді, ол төмен энергия талаптарына ие және бұл өте үнемді. Күн энергиясына негізделген суды бөлу арқылы сутектің электрохимиялық өндірісі жоғары энергия талаптары жауап береді. Биологиялық жүйелердің төмен конверсиялық тиімділігі төмен энергия шығындарымен және бастапқы инвестициялық шығындардың төмендеуімен өтелуі мүмкін. Цианобактериялық сутегінің өндірілуі мен кәдеге жаратылуына әр түрлі кедергілер болса да, әлеуетті шешімдер де жақын болашақта пайда болуы мүмкін. Цианобактерия түрлерінің ішінде *Anabaena* түрлері сутегі энергиясын бөліп шығару үшін маңызды

түрлер болып табылады. Болашақта мардымды өндірісте қолдануға мүмкіндік беретін штаммдарды жасап шығару үшін міндетті түрде генетикалық манипуляциялау жұмыстарын жүргізу керек.

Қаржыландыру

Бұл мақала келесі жобалардан қаржыландырылды: AP13067574, AP14869048..

Мүдделер қақтығысы

Мүдделер қақтығысы жоқ..

Әдебиеттер

- 1 Spiller H., Ernst A., Kerfin W., Böger P. Increase and stabilization of photoproduction of hydrogen in *Nostoc muscorum* by photosynthetic electron transport inhibitors // Zeitschrift für Naturforschung. – 1978. – Vol. 33. – P. 541–47.
- 2 Burrows E., Chaplen F., Ely R. Effects of selected electron transport chain inhibitors on 24-h hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Bioresource technology. – 2010. – Vol. 102. – P. 3062–70.
- 3 Abdelwahab H.E.M. Hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 with engineered subunit of the bidirectional H₂-ase // Advances in Life Science and Technology. – 2014. – Vol. 18. – P. 7–19.
- 4 Sadvakasova A.K., Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Alwasel S., Najafpour M.M., Tatsuya T., Allakhverdiev S.I. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2020. – Vol. 133. – P. 110054. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110054>
- 5 Tiwari A., Pandey A. Cyanobacterial hydrogen production – a step towards clean environment // Int J Hydrogen Energy. – 2012. – Vol. 37. – P. 139–50.
- 6 Kaushik A., Anjana K. Biohydrogen production by *Lyngbya perelegans*: influence of physic-chemical environment // Biomass Bioenergy. – 2011. – Vol. 35. – P. 1041–5.
- 7 Razeghihifard R. Algal biofuels // Photosynth Res. – 2013. – Vol. 117. – P. 207–19.
- 8 Tamburic B., Zemichael F.W., Maitland G.C., Hellgardt K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Int J Hydrogen Energy. – 2011. – Vol. 36. – P. 7872–6.
- 9 Antal T.K., Kredeleva T.E., Tyystjärvi E. Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production // Photosynth Res. – 2015. – Vol. 125, No 3. – P. 357–81.
- 10 Kosourov S., Tsygankov A., Seibert M., Ghirardi M.L. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters // Biotechnol Bioeng. – 2002. – Vol. 78, No 3. – P. 731–40.
- 11 Stebegg R. Heterotrophic Growth of the Cyanobacterium *Anabaena* (*Nostoc*) sp. strain PCC7120 and its Dependence on a Functional Cox1 Locus Encoding Cytochrome C Oxidase, Dissertation (Master in Genetics – Microbiology) Universität Wien, Wien, 2011, p. 130.
- 12 Yeager C.M., Milliken C.E., Bagwell C.E., Staples L., Berseth P.A., Sessions H.T. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous cyanobacteria // Int J Hydrogen Energy. – 2011. – Vol. 36. – P. 7487–99.
- 13 Masukawa H., Nakamura K., Mochimaru M., Sakurai H. Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: Miyake J., Matsunaga T., San Pietro A., BioHydrogen II. – United Kingdom: Elsevier 2001. – P. 63–6.
- 14 Allahverdiyeva Y., Leino H., Saari L., Fewer D.P., Shunmugam S., Sivonen K., et al. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes // Int J Hydrogen Energy. – 2010. – Vol. 35. – P. 1117–27.
- 15 Berberoglu H., Jay J., Pilon L. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // Int J Hydrogen Energy. – 2008. – Vol. 33. – P. 1172–84.
- 16 Sveshnikov D.A., Sveshnikova N.V., Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress // FEBS Microbiol Lett. – 1997. – Vol. 147. – P. 297–301.
- 17 Vyas D., Kumar H.D. Nitrogen fixation and hydrogen uptake in four cyanobacteria // Int J Hydrogen Energy. – 1995. – Vol. 20, No 2. – P. 163–8.
- 18 Tsygankov A., Serebryakova L., Rao K., Hall D. Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations // FEMS Microbiol Lett. – 1998. – Vol. 167. – P. 13–7.
- 19 Markov S.A., Protasov E.S., Bybin V.A., Eivazova E.R., Stom D.I. Using immobilized cyanobacteria and culture medium contaminated with ammonium for H₂ production in a hollow-fiber photobioreactor // Int J Hydrogen Energy. – 2015. – Vol. 40. – P. 4752–7.

- 20 Benemann J.R. Hydrogen production by microalgae // J Appl Phycol. – 2000. – Vol. 12. – P. 291–300.
- 21 Tamagnini P., Troshina O., Oxelfelt F., Salema R., Lindblad P. Hydrogenases in *Nostoc* sp. strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme // Appl Environ Microbiol. – 1997;63. – P. 1801–7.
- 22 Bergman B., Gallon J.R., Rai A.N., Stal L.J. N_2 fixation by non-heterocystous cyanobacteria // FEMS Microbiol Rev. – 1997. – Vol. 19. – P. 139–85.
- 23 Herrero A., Muro-Pastor A.M., Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria // J. Bacteriol – 2001. – Vol. 183. – P. 411–25.
- 24 Borodin V.B., Tsygankov A., Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions // Biotechnol. Bioeng. – 2000. – Vol. 69:479–85.
- 25 Benemann J.R., Weare N.M. Hydrogen evolution by nitrogen fixing *Anabaena cylindrica* cultures // Science. – 1974. – Vol. 184. – P. 174.
- 26 Kufryk G. Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production // Advances in Microbiology – 2013. – Vol. 3. – P. 60–8.
- 27 Manis S., Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes // Int. J. Hydrogen Energy. – 2008. – Vol. 33. – P. 279–86.
- 28 Hankamer B., Lehr F., Rupprecht J., Mussnug J., Posten C., Kruse O. Photosynthetic biomass and H_2 production by bioengineering to green algae: from bioreactor scale-up // Physiol Plantarum. – 2007. – Vol. 131. – P. 10–21.
- 29 Zhang X.K., Haskell J.B., Tabita F.R., Van B.C. Aerobic hydrogen production by the heterocystous cyanobacteria *Anabaena* spp. strains CA and 1F // J Bacteriol. – 1983. – Vol. 156. – P. 1118–22.
- 30 Horiuchi J., Kikuchi S., Kobayashi M., Kanno T., Shimizu T. Modeling of pH response in continuous anaerobic acidogenesis by an artificial neural network // Biochem Eng J. – 2001. – Vol. 9. – P. 199–204.
- 31 Show K.-Y., Lee D.-J., Chang J.-S. Bioreactor and process design for biohydrogen production // Bioresour Technol. – 2011. – Vol. 102. – P. 8524–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.055>
- 32 Yu J., Takahashi H. Biophotolysis-Based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. In: A. Méndez-Vilas, Ed., Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology // Formatex. – 2007. – Vol. 1. – P. 79–89.
- 33 Kossalbayev B.D., Tomo T., Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K., Alwasel S., Allakhverdiev S.I. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production // International Journal of Hydrogen Energy. – 2020. – Vol. 45, No 4. – P. 2627–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.164>
- 34 Masirbaeva A.D., Baidyldaeva Z.A., Sadanov A.K., Baigonosova Z.A., Ultanbekova G.D. Study of nitrogen-fixing activity and competitive ability of nodule bacteria of the genus *Rhizobium* // Biological and medical series. – 2014. – Vol. 2. – P. 3252–62.
- 35 Uma L., Subramanian G. Effective use of cyanobacteria in effluent treatment. In proceedings of the national symposium on cyanobacterial N_2 fixation. New Delhi: IARI, 1990. 437–44.
- 36 Zhakeeva M.B., Bekenova U.S., Zhumadilova Z.S., Shorabaev E.Z., Sadanov A.K. Study of ecological and trophic groups of soil microorganisms under alfalfa and soybeans using biological products of the Rizovit-AKS series // Success of modern natural science. – 2015. – Vol. 2. – P. 144–7.
- 37 Weissman J.C., Benemann J.R. Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica* // Appl Environ Microbiol. – 1977. – Vol. 33. – P. 123–31.
- 38 Benemann J.R., Miyamoto K., Hallenbeck P.C. Bioengineering aspects of biophotolysis // Enzyme Microbiol Technol. – 1980. – Vol. 2. – P. 103.
- 39 Bolatkhan K., Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Tomo T., Veziroglu V.T., Allakhverdiev S.I. Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives // International Journal of Hydrogen Energy. – 2019. – Vol. 44, No 12. – P. 5799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.092>
- 40 Sundararaman M., Subramanian G., Averal H.I., Akbharsha M.A. Evaluation of the bioactivity of marine cyanobacteria on some biochemical parameters of rat serum // Phytotherapy Res. – 1996. – Vol. 10. – P. 9–12.
- 41 Kaushik B.D., Venkataraman G.S. Effect of algal inoculation on the yield and vitamin C content of two varieties of tomato // Plant Soil. – 1979. – Vol. 52. – P. 135–7.
- 42 Choudhury K.K. Occurrence of nitrogen fixing cyanobacteria during different stages of paddy cultivation // Bangladesh J Plant Taxon. – 2011. – Vol. 18. – P. 73–6.
- 43 Choudhury A.T.M.A., Kennedy I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production // Biol Fertil Soils. – 2004. – Vol. 39. – P. 219–27.
- 44 Dey H.S., Bastia A.K. Cyanobacterial flora from rice growing areas of Mayurbhanj // Plant Sc Res. – 2008. – Vol. 30. – P. 22–6.
- 45 Khetkorn W., Rastogi R.P., Incharoensakdi A., Lindblad P., Datta M., Pandey A., Larroche C. Microalgal hydrogen production – A review // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 243. – P. 1194–206.
- 46 Gaffron H., Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae // J Gen Physiol. – 1942. – Vol. 26, No 2. – P. 219–40.
- 47 Dutta D., Debojyoti D., Chaudhuri S., Bhattacharya S. Hydrogen production by cyanobacteria // Microbial cell factories. – 2005. – Vol. 4. – P. 36.
- 48 Melis A., Melnicki M.R. Integrated biological hydrogen production // Int J Hydrogen Energy. – 2006. – Vol. 31. – P. 1563–73.
- 49 Momirlan M., Veziroglu T.N. The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner // Int J Hydrogen Energy. – 2005. – Vol. 30. – P. 681–8.

- 50 Mathews J, Wang G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production // Int J Hydrogen Energy. – 2009. – Vol. 34. – P. 7404–16.
- 51 Das D., Veziroglu T.N. Advances in biological hydrogen production processes // Int J Hydrogen Energy. – 2008. – Vol. 33. – P. 6046–57.
- 52 Fani R., Gallo R., Liò P. Molecular evolution of nitrogen fixation: The evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes // J Mol Evol. – 2000. – Vol. 51. – P. 1–11.
- 53 Miller R.W., Eady R.R. Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase // Biochem J. – 1988. – Vol. 256. – P. 429–32.
- 54 Valladares A., Muro-Pastor A.M., Fillat M.F., Herrero A., Flores E. Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *petH* gene encoding ferredoxin: NADP⁺ reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 449. – P. 159–64.
- 55 Hallenbeck P.C. Hydrogen Production by Cyanobacteria. In book: Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production Publisher: Springer US, 2011.P.15–28.
- 56 Alberto A.E.F., Henrique C.J., Marcelo V., Alvarenga V., Nunes-Adriano N., Wagner A. Cyanobacterial nitrogenases: Phylogenetic diversity, regulation and functional predictions // Genetics and Molecular Biology. – 2017. – Vol. 40. – P. 261–75.
- 57 Suzuki I., Horie N., Sugiyama T., Omata T. Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation // J Bacteriol. – 1995. – Vol. 177. – P. 290–6.
- 58 Bergman M., Perewoska I., Kirilovsky D. Redox control of *ntcA* gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 125. – P. 969–81.
- 59 Thiel T., Lyons E.M., Erker J.C. Characterization of genes for a second Mo-dependent nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Bacteriol. – 1997. – Vol. 179. – P. 5222–5.
- 60 Kentemich T., Danneberg G., Hundeshagen B., Bothe H. Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // FEMS Microbiol Lett. – 1988. – Vol. 51. – P. 19–24.
- 61 Gudrun B., Caroline S., Lucas S., Hermann B. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase // Archives of microbiology. – 2006. – Vol. 186. – P. 367–76.
- 62 Thiel T. Isolation and characterization of the *vnfEN* genes of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J Bacteriol. – 1996. – Vol. 178. – P. 4493–9.
- 63 Paulette V. Hydrogenases and H⁺ reduction in primary energy conservation // Results and problems in cell differentiation. – 2008. – Vol. 45. – P. 223–52.
- 64 Tamagnini P., Leitao E., Oliveira P., Ferreira D., Pinto F., Harris D.J., Heidorn T., Lindblad P. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications // FEMS Microbiology Reviews. – 2007. – Vol. 31. – P. 692–720.
- 65 Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wüschiers R., Lindblad P. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria // Microbiology and molecular biology reviews: MMBR. – 2002. – Vol. 66. – P. 1–20.
- 66 Smith G.D., Ewart G.D., Tucker W. Hydrogen production by cyanobacteria // Int J Hydrogen Energy. – 1992. – Vol. 17. – P. 695–8.
- 67 Boison G., Schmitz O., Mikheeva L., Shestakov S., Bothe H. Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // FEBS Lett. – 1996. – Vol. 394. – P. 153–8.
- 68 Boison G., Bothe H., Schmitz O. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR // Curr Microbiol. – 2000. – Vol. 40. – P. 315–21.
- 69 Sheremetieva M.E., Troshina O.Y., Serebryakova L.T., Lindblad P. Identification of *hox* genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions // FEMS Microbiol Lett. – 2002. – Vol. 214. – P. 229–33.
- 70 Houchins J.P. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria // Biochim Biophys Acta. – 1984. – Vol. 768. – P. 227–55.
- 71 Schmitz O., Boison G., Salzmann H., Bothe H., Schutz K., Wang S.H., Happe T. HoxE – a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria // Biochim Biophys Acta. – 2002. – Vol. 1554. – P. 66–74.
- 72 Oxelfelt F., Tamagnini P., Lindblad P. Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102 cloning and characterization of a *hupSL* homologue // Arch Microbiol. – 1998. – Vol. 169. – P. 267–74.
- 73 Weyman P., Brenda P., Thiel T. Transcription of *hupSL* in *Anabaena variabilis* ATCC 29413 is regulated by *NtcA* and not by hydrogen // Applied and environmental microbiology. – 2008. – Vol. 74. – P. 2103–10.
- 74 Carrasco C.D., Buettner J.A., Golden J.W. Programed DNA rearrangement of a cyanobacterial *hupL* gene in heterocysts // Proc Natl Acad Sci. – 1995. – Vol. 92. – P. 791–5.
- 75 Tsygankov A.A. Nitrogen-fixing cyanobacteria: producents of hydrogen // Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya. – 2007. – Vol. 43, No 3. – P. 279–88.
- 76 Carrasco C.D., Garcia J.S., Golden J.W. Programmed DNA rearrangement of a hydrogenase gene during *Anabaena* heterocyst development // BioHydrogen. – 1998. – Vol. – P. 203–7.
- 77 Gutthann F., Egert M., Marques A., Appel J. Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics. – 2007. – Vol. 1767. – P. 161–9.
- 78 Batyrova K., Hallenbeck P. Hydrogen production by a *Chlamydomonas reinhardtii* strain with inducible expression of photosystem II // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18. – P. 647.

- 79 Komenda J. Photosystem 2 photoinactivation and repair in the *Scenedesmus* cells treated with herbicides DCMU and BNT and exposed to high irradiance // *Photosynthetica*. – 1998. – Vol. 35. – P. 477–80.
- 80 Cournac L., Guedeney G., Peltier G., Vignais P.M. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – P. 1737–46.
- 81 Torimura M., Miki A., Wadano A., Kano K., Ikeda T. Electrochemical investigation of cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC7942-catalyzed photoreduction of exogenous quinones and photoelectrochemical oxidation of water // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2001. – Vol. 496. – P. 21–8.
- 82 Pisciotto J.M., Zou Y., Baskakov I.V. Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5. – P. e10821.
- Imafuku H., Katoh T. Intracellular ATP level and light-induced inhibition of respiration in a blue-green alga, *Anabaena variabilis* // *Plant & Cell Physiology*. – 1976. – Vol. 17. – P. 515–24.
- 84 Berg S.P., Krogmann D.W. Mechanism of KCN inhibition of photosystem I // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250. – P. 8957–62.
- 85 Hihara Y., Sonoike K., Kanehisa M., Ikeuchi M. DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // *Journal of bacteriology*. – 2003. – Vol. 185. – P. 1719–25.
- 86 Boris V., Trubitsin V.V., Ptushenko O.A., Koksharova M.D., Mamedov L.A., Vitukhnovskaya I.A., Grigorev A.Y., Semenov A.N., Tikhonov E.P.R. Study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains // *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. – 2005. – Vol. 1708. – P. 238–49.
- 87 Carrieri D., Wawrousek K., Eckert C., Yu I., Maness P.-J. The role of bidirectional hydrogenases in cyanobacteria // *Bioresour. Technol.* – 2011. – Vol. 102. – P. 8368–77.
- 88 Alalayah W.M., Alhamed Y.A., Al-zahrani A., Edris G. Influence of culture parameters on biological hydrogen production using green algae *Chlorella vulgaris* // *Rev Chim.* – 2015. – Vol. 66. – P. 788–91.
- 89 Song W., Rashid N., Choi W., Lee K. Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis // *Bioresour Technol.* – 2011. – Vol. 102. – P. 8676–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.082>.
- 90 Melis A. Photosynthesis-to-fuels: from sunlight to hydrogen, isoprene, and botryococcene production // *Energy Environ Sci.* – 2012. – Vol. 5. – P. 5531–9. <https://doi.org/10.1039/C1EE02514G>.
- 91 Mizuno Y., Sato A., Watanabe K., Hirata A., Takeshita T., Ota S. Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species // *Bioresour Technol.* – 2013. – Vol. 129. – P. 150–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>.
- 92 Axelsson R., Lindblad P. Transcriptional regulation of Nostoc hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 444–7.
- 93 Rashid N., Lee K., Han J.I., Gross M. Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light // *Bioproc Biosyst Eng.* – 2013. – Vol. 36. – P. 867–72. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0819-9>.
- 94 Liu J.-Z., Ge Y.-M., Xia S.-Y., Sun J.-Y., Mu J. Photoautotrophic hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur-deprivation // *Int J Hydrogen Energy*. – 2016. – Vol. 41. – P. 8427–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.191>
- 95 Boboescu I.Z., Gherman V.D., Lakatos G., Pap B., Biro T., Maroti G. Surpassing the current limitations of biohydrogen production systems: the case for a novel hybrid approach // *Bioresour Technol.* – 2016. – Vol. 204. – P. 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.083>.
- 96 Lopez-Hidalgo A.M., Alvarado-Cuevas Z.D., De LeonRodriguez A. Biohydrogen production from mixtures of agro-industrial wastes: chemometric analysis, optimization and scaling up // *Energy*. – 2018. – Vol. 159. – P. 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.06.124>.
- 97 Ramchandran S., Mitsui A. Recycling of hydrogen photoproduction system using an immobilized marine blue green algae *Oscillatoria* sp. Miami BG7, solar energy and seawater [abstract] // VII International Biotechnology Symposium. 1984. pp. 183–4.
- 98 Moezelaar R., Bijvank S.M., Stal L.J. Fermentation and Sulfur Reduction in the Mat-Building Cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // *Appl Environ Microbiol.* – 1996. – Vol. 62, No 5. – P. 1752–8.
- 99 Datta M., Nikki G., Shah V. Cyanobacterial hydrogen production // *World J Microbiol Biotechnol* – 2000. – Vol. 16. – P. 8–9.
- 100 Aoyama K., Uemura I., Miyake J., Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis* // *J Ferment Bioeng.* – 1997. – Vol. 83. – P. 17–20.
- 101 Zayadan B.K., Kossalbayev B.D., Tomo T., Allakhverdiev S.I., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K., Kakimova A. Study of promising heterocystic cyanobacterial strains for biohydrogen production // *series of biological and medical*. – 2020. – Vol. 3, No 339. – P. 41–8.
- 102 Lambert G.R., Daday A., Smith G.D. Hydrogen evolution from immobilized cultures of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* B629 // *FEBS Lett.* – 1979. – Vol. 101, No 1. – P. 125–8.
- 103 Radway J.C., Yozua B.A., Benemann J.R., Chini Zitelli G., Malda J., Babcock R.W., Jr, Tredici M.R. Evaluation of a near-horizontal tubular photobioreactor system in Hawaii [abstracts] 8th International Conference on Applied Algology: Montecassini, Italy. 1999.
- 104 Vargas S.R., Santos P.V., Zaiat M., Calijuri M.C. Optimization of biomass and hydrogen production by *Anabaena* sp. (UTEX 1448) in nitrogen-deprived cultures // *Biomass and Bioenergy*. – 2018. – Vol. 111. – P. 70–6.

- 105 Cassier-Chauvat C., Veaudor T., Chauvat F. Advances in the function and regulation of hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15. – P. 19938–51.
- 106 Nyberg M., Heidorn T., Lindblad P. Hydrogen production by the engineered cyanobacterial strain *Nostoc* PCC 7120 Δ hupW examined in a flat panel photobioreactor system // Journal of Biotechnology. – 2015. – Vol. 215. – P. 35–43.
- 107 Jeffries T.W., Timourian T.H., Ward R.L. Hydrogen Production by *Anabaena cylindrica*: Effects of Varying Ammonium and Ferric Ions, pH, and Light // Applied and environmental microbiology. – 1978. – Vol. 1 – P. 704–10.
- 108 Tsygankov A.A., Borodin V.B., Rao K.K., Hall D.O. H₂ photoproduction by batch culture of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and its mutant PK84 in a photobioreactor // Biotechnol Bioeng. – 1999. – Vol. 64, No 6. – P. P. 709-15.
- 109 Shah V., Garg N., Madamwar D. Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production // Folia Microbiol (Praha). – 2003. – Vol. 48(1). – P. 65-70.
- 110 Hallenbeck P.C., Kochian L.V., Weissmann J.C., Benemann J.R. Solar energy conversion with Hydrogen producing cultures of the blue green alga, *Anabaena cylindrica* // Biotechnology and Bioengineering Symposium. – 1978. – Vol. 8. – P. 283–97.
- 111 Bakonyi P., Kumar G., Belafi-Bak o K., Kim S.-H., Koter S., Kujawski W., et al. A review of the innovative gas separation membrane bioreactor with mechanisms for integrated production and purification of biohydrogen // Bioresour Technol. – 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.020>.
- 112 Rashid N., Lee K., Han J.I., Gross M. Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light // Bioproc Biosyst Eng. – 2013. – Vol. 36. – P. 867–72. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0819-9>.
- 113 Qiao H., Wang G. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01 // Chin J Oceanol Limnol. – 2009. – Vol. 27. – P. 762–8. <https://doi.org/10.1007/s00343-009-9216-x>
- 114 Ernst A., Kerfin W., Spiller H., Boger P. External factors influencing light-induced H₂ evolution by the blue-green algae, *Nostoc muscorum* // Zeitschrift für Naturforschung. – 1979. – Vol. 34. – P. 820–5.

S.S. Kassymbekova* , T.A. Bukeyeva , I.E. Bishimova ,
S.G. Murzageldinova , I.S. Korotetskiy 

Scientific Center for Anti-Infectious Drugs, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: s_kassymbekova@mail.ru

DIFFERENTIAL CYTOKINE RESPONSE OF IMMUNOCOMPETENT CELLS TO THE INDUCTION OF RESISTANT, REVERTANT AND SENSITIVE *ESCHERICHIA COLI*

The work is devoted to the study of the influence of the resistance phenotype of *E. coli* subcultures on the functionality of evolutionarily conserved pathogen-associated antigens (PAMP) and a special class of pathogen-associated molecular patterns indicating the viability of microbes (vitaPAMP) on immunocompetent human peripheral blood cells. In this work, we used the resistant *E. coli* strain ATCC BAA-2523, the sensitive *E. coli* strain ATCC 8739, and the revertant subculture of *Escherichia coli* obtained under experimental conditions from the *E. coli* strain ATCC BAA-196. Using enzyme immunoassay, we performed a comparative analysis of mononuclear (PBMC), monocytic (MON), and lymphocytic (LIM) cytokine responses to the induction of resistant, revertant, and susceptible *E. coli* subcultures by living and fixed cells. It turned out that the PAMP structures of subcultures of fixed *E. coli* cells are predominantly recognized by human PBMCs. While the pathogen-associated molecular patterns of living *E. coli* cells are recognized by different target cells, therefore, PBMCs primarily respond to the structures of the vitaPAMP-resistant subculture, while the structures of the revertant *E. coli* – human MON react to the structures of the vitaPAMP, which is a sensitive strain and PBMC – and MON respond to vitaPAMP. It has also been shown that, in response to fixed cultures of *E. coli* S and *E. coli* R, there is a decrease in the threshold level of production of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in both PBMCs and monocytes, compared with the level of cytokine production induced by live bacteria. Whereas fixed cells of revertant *E. coli* caused a higher production of pro-inflammatory cytokines PBMC than living cells of this culture.

Key words: Cytokines, resistant, revertant, sensitive.

С.С. Қасымбекова*, Т.А. Букеева, И.Е. Бишимова,
С.Г. Мурзагельдинова, И.С. Коротецкий

«Инфекцияға қарсы препараттардың ғылыми орталығы» АҚ, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: s_kassymbekova@mail.ru

Иммунокомпетентті жасушалардың төзімді, ревертантты және сезімтал ішек таяқшаларының индукциясына дифференциалды цитокиндік реакциясы

E. coli субкультураларының төзімділік фенотипінің эволюциялық консервативті, бөгде антигендердің (PAMP) функционалдығына әсерін және адамның перифериялық қанының иммунокомпетентті жасушаларына микробтардың (vitaPAMP) өміршеңдігін білдіретін патогенге байланысты молекулалық заңдылықтардың ерекше класын зерттеуге арналған жұмыс. Жұмыс барысында ATCC BAA-196 *E. coli* штаммынан тәжірибелік жағдайда алынған ATCC BAA-2523 *E. coli* тұрақты штаммы, ATCC 8739 *E. coli* сезімтал штаммы және *E. coli* ревертантты субкультурасы пайдаланылды. Иммуноферменттік талдау арқылы *E. coli* төзімді, ревертантты және сезімтал субкультураларының тірі және бекітілген жасушаларын индукциялауға мононуклеарлық (PBMC), моноциттік (MON) және лимфоциттік (LYM) цитокиндік реакцияға жауаптардың салыстырмалы талдауы жүргізілді. Зерттелген *E. coli* субкультураларының бекітілген жасушаларының PAMP құрылымы негізінен адамның PBMC танитыны белгілі болды. Тірі *E. coli* жасушаларының патоген-байланысты молекулалық заңдылықтарын әртүрлі мақсатты жасушалар таниды, сондықтан төзімді субкультураның vitaPAMP құрылымдары негізінен PBMC-мен, ревертантты *E. coli*-MON адамның vitaPAMP құрылымына, сезімтал штаммының және PBMC-нің vitaPAMP құрылымына және MON-ға бірдей қарқындылықпен жауап береді. *E. coli* S және *E. coli* R тұрақты дақылдарына жауап ретінде тірі бактериялар қоздырған цитокиндердің өнім деңгейімен салыстырғанда PBMC-те де, моноциттерде де ИЛ-1 β , ИЛ-6 және ФНО- α өнімдерінің шекті деңгейі төмендегені

көрсетілген. Ал ревертантты *E. coli* тұрақты жасушалары осы дақылдың тірі жасушаларына қарағанда қабынуға қарсы РВМС цитокиндерінің жоғары өндірісін тудырды.

Түйін сөздер: цитокиндер, төзімді, ревертант, сезімтал.

С.С. Касымбекова*, Т.А. Букеева, И.Е. Бишимова,
С.Г. Мурзагельдинова, И.С. Коротецкий

АО «Научный центр противомикробных препаратов», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: s_kassymbekova@mail.ru

Дифференциальный цитокиновый ответ иммунокомпетентных клеток на индукцию резистентной, ревертантной и чувствительной *Escherichia coli*

Работа посвящена изучению влияния фенотипа резистентности субкультур *E.coli* на функциональность эволюционно-консервативных патоген-ассоциированных антигенов (PAMP) и особого класса патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, которые обозначают жизнеспособность микробов (vitaPAMP) на иммунокомпетентные клетки периферической крови человека. В работе использовали устойчивый штамм *E.coli* ATCC BAA-2523, чувствительный штамм *E.coli* ATCC 8739 и ревертантную субкультуру *E.coli*, полученную в условиях эксперимента из штамма *E.coli* ATCC BAA-196. С помощью иммуноферментного анализа проведен сравнительный анализ мононуклеарного (РВМС), моноцитарного (МОН) и лимфоцитарного (ЛМ) цитокинового ответа на индукцию живыми и фиксированными клетками резистентной, ревертантной и чувствительной субкультур *E.coli*. Оказалось, что PAMP структуры фиксированных клеток изученных субкультур *E.coli* преимущественно распознаются РВМС человека. Тогда как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны живых клеток *E.coli* распознаются разными клетками-мишенями. Так на vitaPAMP структуры резистентной субкультуры реагируют преимущественно РВМС, на vitaPAMP структуры ревертантной *E.coli* – МОН человека, на vitaPAMP структуры чувствительного штамма и РВМС, и МОН реагируют с одинаковой интенсивностью. Показано, что в ответ на фиксированные культуры *E. coli* S и *E. coli* R происходит снижение порогового уровня продукции ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α как в РВМС, так и в моноцитах, по сравнению с уровнем продукции цитокинов, индуцированных живыми бактериями. Тогда как фиксированные клетки ревертантной *E. coli* вызывали более высокую продукцию провоспалительных цитокинов РВМС, чем живые клетки этой культуры.

Ключевые слова: цитокины, резистентный, ревертантный, чувствительный.

Abbreviations

PBMC – peripheral blood mononuclear cells, MON – monocytes, PAMP – pathogen-associated molecular patterns, LYM – lymphocytes, MIC – minimum inducing concentration.

Introduction

The problem of antibiotic resistance and ways to overcome it has been actively studied for the past 30-40 years. However, in most cases, by the time bacterial infections cause symptoms and therefore require antibiotic treatment, the bacterial population is often so large that it probably includes a portion of antibiotic-resistant mutants [1]. Therefore, treatment with an antimicrobial drug alone can be expected to fail. One of the reasons why this is often not the case is the host's immune defence, which promotes bacterial clearance [2, 3]. Despite the general recognition of the important role of host defence, most studies of the dynamics of bacteria and antibiotics within the body are focused almost exclusively on the

pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs and bacteria, without explicit consideration of the patient's immune response [4-6]. This omission of the immune response also refers to models that are specifically designed to develop treatment protocols to combat the emergence of resistant mutants [7-9].

Resistant bacteria are selected in a concentration range of drugs that is sufficient to kill a susceptible population but not sufficient to kill a (partially) resistant population. In the absence of an immune response, such treatment will lead to an increase in the number of resistant pathogens and treatment failure [10]. Scientists have shown [11-13] that the presence of an immune response can change the selection process for resistant mutants. They showed that an immune response that remains strong despite a strong drug-induced reduction in bacteria significantly reduces the emergence of resistance and mitigates the consequences of non-compliance with therapy.

Considering that a complex immunobiological reaction of the body lies at the heart of the treatment of a patient with antimicrobial drugs, it is important

to study the nature of the specificity of immune response to antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant pathogens. The results of studying the differential role of various immunocompetent cells in the initiation of an immune response to pathogens with different antibiotic sensitivity profiles reveal the mechanisms of the relationship between infectious diseases caused by drug-resistant pathogens, induction and regulation of the innate and adaptive immune response, and antibiotics. Knowledge of this kind can open new ways to combat drug resistance of pathogens by developing more effective approaches to complex immunotherapy of infectious diseases.

The experimental conditions we have chosen allow us to perform a pairwise comparison of the cytokine response of PBMC and monocytes from the same donor to live and fixed cells of resistant, revertant and sensitive *E. coli*. Thus, this allows us to clarify the differences in PBMC and monocytic response between different subcultures of *E. coli*, as well as to assess the effect on these indicators of bacterial viability and to determine the proportion of the lymphocytic cytokine response in the total PBMC response to *E. coli*, which are distinctive in antibiotic sensitivity.

1. Materials and Methods

The experiment used peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from 6 healthy donors (with no acute diseases and severe chronic diseases) male and females aged 28 to 38 years and monocytes isolated from the PBMC fraction of the same donors by immunomagnetic separation. The non-monocyte PBMC fraction – lymphocytes (LYM) was obtained after the isolation of monocytes on an immunomagnetic separator (positive fraction – non-monocytes). All manipulations with human cells have been approved by the Ethics Commission. The work was carried out following the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving human subjects.

1.1. Isolation of mononuclear fraction of cells

Heparinized human peripheral blood was premixed with 6% dextran to precipitate erythrocytes. Incubated at room temperature for 1.5-2 hours. After the incubation time, the supernatant was precipitated at 300 g for 10 min at room temperature to obtain a cell suspension. The resulting cell suspension was fractionated on a Histopaque-1.077 density gradient (Sigma, USA) corresponding to the buoyant density of human PBMC at 4 °C at 3000 rpm for 20 min. After that PBMC were collected and washed by centrifugation at 300g for 10 min at room

temperature, after which they were resuspended in RPMI-1640 culture medium containing 10 % fetal bovine serum and 2 % L-glutamine (all from Sigma, USA). In all experiments, a PBMC suspension with a percentage of viable cells greater than 90 % was used.

1.2 Isolation of monocytes by immunomagnetic separation

Isolation of monocytes from the PBMC fraction was performed using the Monocyte Isolation Kit II, following the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec, Germany). Isolation was carried out using the "Deplete" program, which carries out a negative selection with the release of enriched monocytes. The resulting population of monocytes was centrifuged at 300 g for 10 min at room temperature. In all experiments, a suspension of monocytes with a percentage of viable cells greater than 90 % was used.

1.3 Test cultures of microorganisms

In a study of the following strains were used: 1) resistant strain of *Escherichia coli* ATCC BAA-2523 (ATCC) was conventionally designated as "R" culture in the experiments [14], 2) a sensitive *Escherichia coli* strain ATCC 8739 (ATCC), designated as "S" culture [15] and 3) a revertant subculture of *Escherichia coli* was obtained under experimental conditions earlier [16, 17] from *Escherichia coli* ATCC BAA-196 (ATCC), producing extended-spectrum beta-lactamase. In the experiments, the subculture was conventionally designated as "Rev".

The bacteria were cultured on a solid nutrient medium until the middle of the logarithmic growth phase at a temperature of 37 ± 1 °C. Bacteria for research were prepared as described [16]. The study used the minimum inducing concentration (MIC), which was previously determined [16]. For the resistant *E. coli* R strain, the MIC value was 10^3 CFU/ml, for the sensitive *E. coli* S strain and the revertant *E. coli* Rev – 10^4 CFU/ml. The exposure time of bacterial cells to formalin was determined from the results of microbiological control of the cultural survival [16].

1.4 Co-cultivation of cells with test cultures

PBMC and monocytes were plated in 96-well flat-bottom plates (BD Falcon, USA) at a concentration of 1×10^5 cells/well. Then to PBMC and monocytes was added a certain strain of *E. coli* at a concentration of MIC, in a volume of 100 µl/well.

Immunocompetent cells and bacteria were co-cultivated in RPMI-1640 culture medium containing 10 % PBS and 2 % L-glutamine without antibiotics

for 4 hours at 37 °C, 5 % CO₂ and 95 % humidity. At the end of the incubation time, the plates were centrifuged at 300 g for 10 min at room temperature and the supernatant was collected for analysis.

1.5 Determination of cytokine concentrations

The quantitative determination of cytokines was carried out by enzyme immunoassay using commercial reagent kits for alpha-TNF-ELISA-BEST, INTERLEUKIN-6-ELISA-BEST, INTERLEUKIN-1 beta-ELISA-BEST (all from VECTOR-BEST, Russia) according to the manufacturer's instructions. Measurement of optical density and calculation of cytokine concentration was performed on a Sunrise RC.4 microplate reader (Tecan, Austria) using Magellan 2.0 software (Tecan, Austria) at a wavelength of 450 nm with a reference filter at 620 nm.

1.6 Statistical Data Processing

All studies were performed in triplicate. For all data, the arithmetic means and standard deviation from the mean were calculated. The significance of differences between experimental data was assessed using GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA), using One-way ANOVA, Column Statistics, and unpaired t-test. Values of the confidence level $P > 0.05$ were considered insignificant.

2. Results and Discussion

Innate immune cells respond to a variety of stimuli, including bacterial, viral, parasitic, or fungal infections, through structurally related receptors called Toll-like receptors (TLRs). TLRs are evolutionarily conserved type I transmembrane receptors that provide a critical link between innate and adaptive immunity. TLRs can individually respond to a limited, specific number of microbial pathogen-associated molecular patterns (PAMP). VitaPAMP, a subset of PAMP specifically expressed by living microorganisms, are indicative of microbial viability. VitaPAMP elicits a strong inflammatory response to counter the heightened threat posed by living microbes compared to their dead counterparts [18]. The interaction of these structures with TLR on innate immune cells regulates the induction of more efficient adaptive immune responses [19-21]. This recognition initiates an intracellular signalling cascade, which culminates in the activation of multiple genes for the pro-inflammatory and immune response.

Pro-inflammatory cytokines, in particular TNF- α , IL-1 β and IL-6, provide additional signals due to the activation of co-stimulating and adhesive molecules, which are necessary for the activation of adaptive immune cells and the subsequent development of protective immune responses against infectious antigens [22, 23].

2.1 Production of IL-1 β by immunocompetent cells and IL-1 β inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures of sensitive, resistant and revertant subcultures of *E. coli*

As a result of a comparative study of the inducibility threshold of cytokine production by human mononuclear cells, monocytes and lymphocytes under the influence of living and fixed cells, sensitive, resistant and revertant *E. coli* cultures, it was found that the level of immunogenicity of PAMP and vitaPAMP structures of these test cultures can differ significantly.

Our studies have shown that the proportion of lymphocytic cytokine response in the total PBMC response for all studied cytokines was insignificant (from 2 to 7 %) and did not depend on the viability and antibiotic sensitivity of the test cultures (data not presented).

In response to stimulation by sensitive and resistant *E. coli* living cells (Figure 1), lower production of IL-1 β by monocytes was detected compared to PBMC. Induction by the revertant culture of *E. coli* showed no significant difference. Upon stimulation of immunocompetent cells by fixed *E. coli* R and *E. coli* Rev, the threshold production of IL-1 β in PBMC was significantly higher than in monocytes.

The threshold production of IL-1 β was significantly ($P < 0.0001$) higher in response to stimulation of immunocompetent cells (PBMC, MON) by living cells of test cultures, i.e. the vitaPAMP structures of the cultures were more immunogenic compared to their PAMP structures. An exception was the induction of PBMC *E. coli* Rev, where there was no significant difference between the PAMP and vitaPAMP structures of this strain. It was found that upon induction of PBMC IL-1 β , the inducing activity of vitaPAMP structures of the sensitive strain is significantly higher than that of the revertant *E. coli* strain, moreover, the PAMP structure of this strain has significantly low immunogenicity, except for *E. coli* Rev, where a slight increase in IL-1 β inducing activity of PAMP structures (Figure 2).

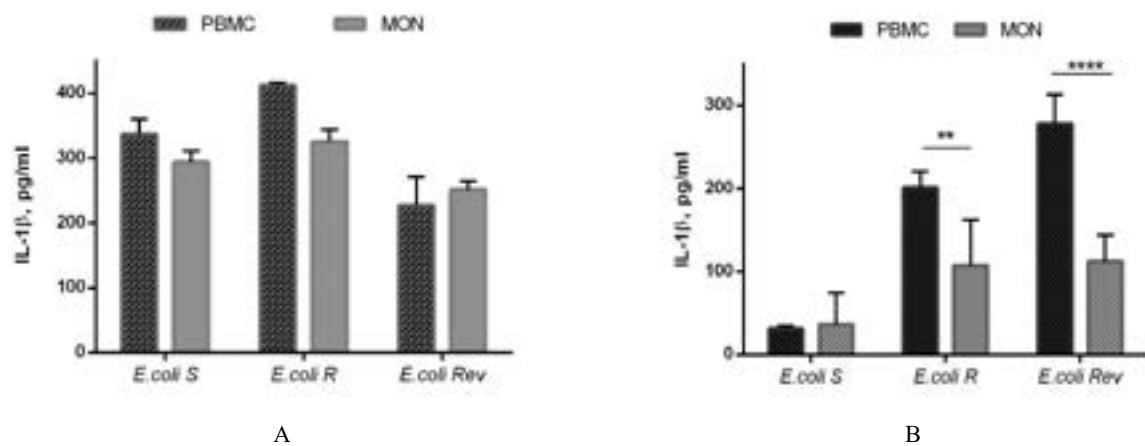


Figure 1 – IL-1 β production by immunocompetent cells, induced by living (A) and fixed (B) cells of sensitive (S), resistant (R) and revertant (Rev) *E. coli* subcultures. All data represent means $\pm$ SEM and are significantly different comparing PBMC and MON by fixed *E. coli* Rev structures (**P = 0.004, ****P < 0.0001)

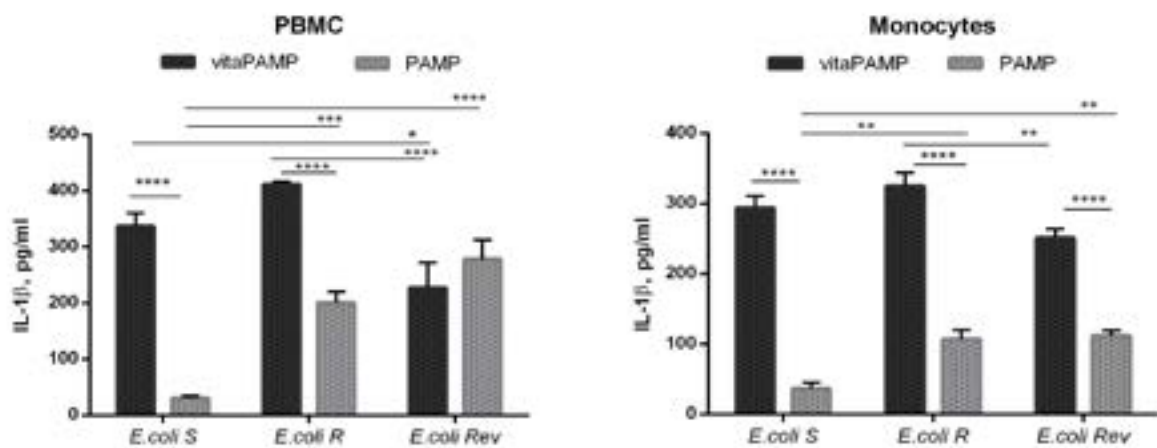


Figure 2 – IL-1 β inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures of sensitive (S), resistant (R) and revertant (Rev) subcultures of *E. coli*. All data represent means $\pm$ SEM and are significantly different comparing vitaPAMP and PAMP *E. coli* subcultures (*P = 0.04, **P < 0.005, ***P = 0.0002, ****P < 0.0001)

2.2 Production of IL-6 by immunocompetent cells and IL-6 inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures of sensitive, resistant and revertant subcultures of *E. coli*

Stimulation by living cells of a sensitive and resistant *E. coli* culture caused comparable levels of IL-6 production by PBMC and MON. Whereas, the vitaPAMP structures of

the revertant culture were recognized mainly by monocytes and led to a significantly ($P < 0.0001$) greater release of IL-6 (Figure 3). The study of the threshold production of IL-6 by immunocompetent cells under the influence of fixed cells of test cultures did not reveal a significant differential response by immunocompetent cells (Figure 3).

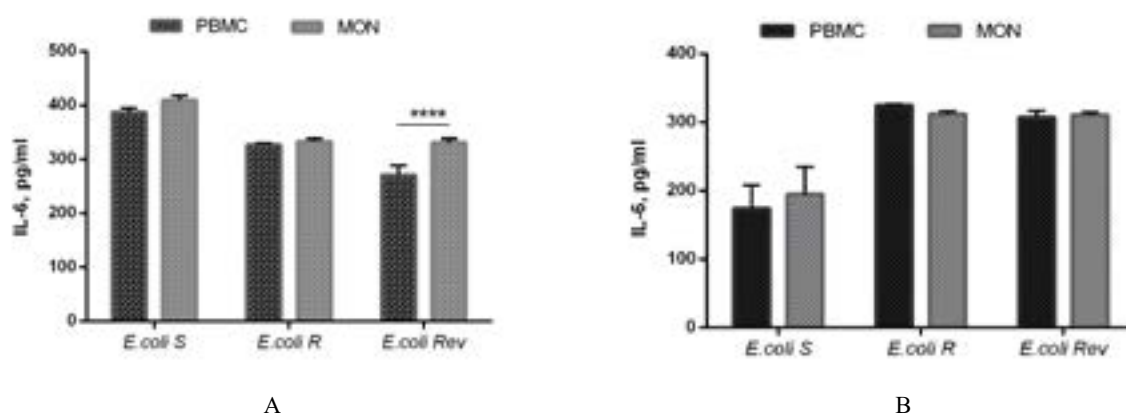


Figure 3 – IL-6 production by immunocompetent cells, induced by living (A) and fixed (B) cells of sensitive (S), resistant (R) and revertant (Rev) *E. coli* subcultures. All data represent means $\pm$ SEM and are significantly different comparing PBMC and MON by living *E. coli* Rev structures (**** $P < 0.0001$)

Comparison of IL-6 production by immunocompetent cells showed that IL-6 inducing activity of resistant and revertant *E. coli* cultures does not depend on cell viability. In contrast, in a susceptible strain, the loss of viability more

than halves the production of IL-6 (Figure 4). IL-6 inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures showed significant differences between susceptible, resistant and revertant cultures (Figure 4).

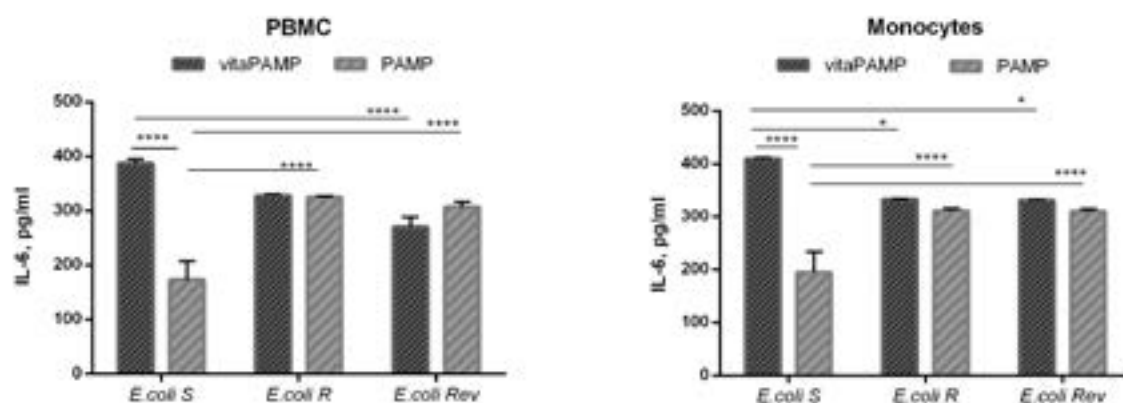


Figure 4 – IL-6 inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures of sensitive (S), resistant (R) and revertant (Rev) *E. coli* subcultures. All data represent means $\pm$ SEM and are significantly different comparing vitaPAMP and PAMP *E. coli* subcultures (* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$)

2.3 Production of TNF- α by immunocompetent cells and TNF- α inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures of sensitive, resistant and revertant subcultures of *E. coli*

The study of the threshold production of TNF- α by immunocompetent cells showed a reliable ($P = 0.0008$) differential response to the induction of PBMC and MON by living cells only by *E. coli* Rev culture (Figure 5).

Analysis of the level of TNF- α production by immunocompetent cells in response to a stimulus by living and fixed cells revealed that the vitaPAMP structures of test cultures are significantly more immunogenic than their PAMP structures (Figure 6). In contrast, the opposite picture is observed with the induction of PBMC *E. coli* Rev, where the immunogenicity of PAMP was slightly higher than with the stimulation of vitaPAMP structures of this strain (Figure 6).

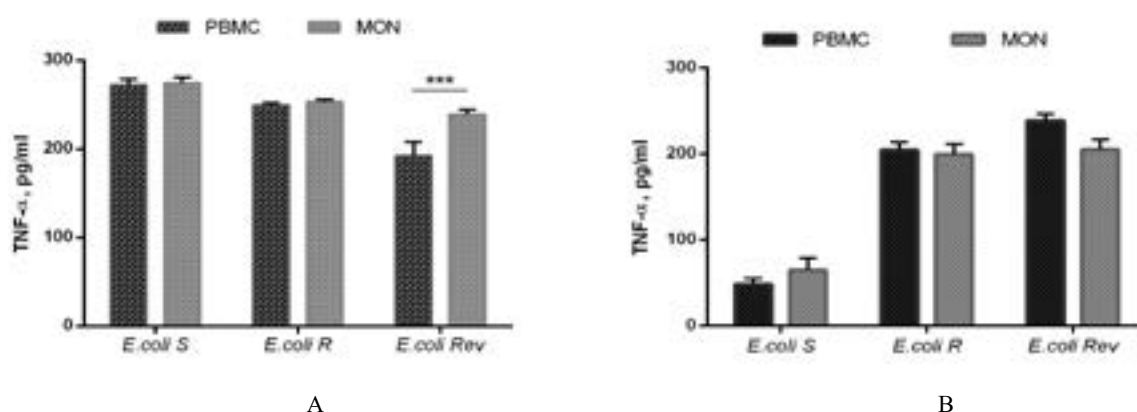


Figure 5 – TNF- α production by immunocompetent cells, induced by living (A) and fixed (B) cells of sensitive (S), resistant (R) and revertant (Rev) *E. coli* subcultures. All data represent means $\pm$ SEM and are significantly different comparing PBMC and MON by living *E. coli* Rev structures (** $P = 0.0008$)

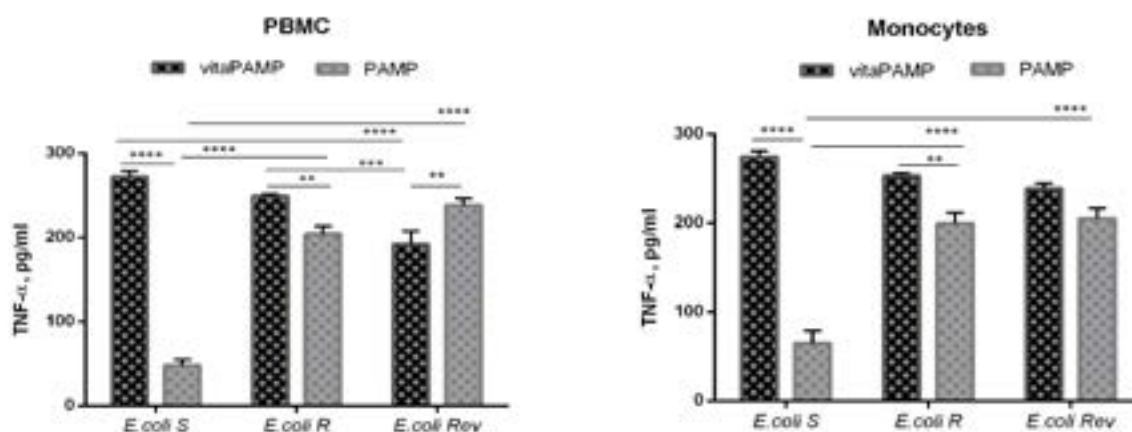


Figure 6 – TNF- α inducing activity of vitaPAMP and PAMP structures of sensitive (S), resistant (R) and revertant (Rev) *E. coli* subcultures. All data represent means $\pm$ SEM and are significantly different comparing vitaPAMP and PAMP *E. coli* subcultures (** $P < 0.009$, *** $P = 0.0004$, **** $P < 0.0001$)

In general, activation of the mechanisms of innate immunity and the induction of production of the main proinflammatory cytokines are known to be caused by the interaction of both PAMP and molecules associated with virulence with the PRR receptors of the cells of the natural immune system, as a result of which a protective inflammatory response is induced for an effective fight against infections [24-26]. It is also known that living bacteria induce much more pronounced immune responses than their preserved (fixed) counterparts [27, 28]. This is explained by the ability to live microorganisms to reproduce and express specialized virulence factors and additional antigens, such as mRNA (vitaPAMP), which activate a pronounced host immune response [29].

Fixed bacterial samples contain only conserved antigenic structures, of which the LPS molecule (PAMP) is the main one. If it has low immunogenicity, then such a fixed sample does not cause proper activation of immunity, as evidenced by our data on archival strains of *E. coli*: antibiotic-susceptible strain – *E. coli* ATCC 8739 and antibiotic-resistant strain – *E. coli* ATCC BAA-2523 (data not published).

It can be assumed that the phenomenon of the revertant subculture of *E. coli* may be associated with changes in the antigenic characteristics of bacteria. In the present study, we used an *E. coli* subculture, whose sensitivity to gentamicin was restored under experimental conditions [17]. Previously, it was shown that as a result

of long-term interaction of the FS-1 preparation with bacteria, a “new or acquired” phenotype is formed, which, possibly, as a result of changes in the genomics, proteomics, and metabolomics of bacteria, leads to a conjugate change in the expression and architectonics of immunogenic molecular structures, and reversal of antibiotic sensitivity [16].

In addition, a comparative analysis of the threshold levels of cytokines produced by immunocompetent cells in response to a stimulus from *E. coli*, which are

distinct in antibiotic sensitivity, showed a different orchestration of cytokines.

To determine the proportion of each cytokine in the total cytokine response, the data obtained were converted into percentage ratios, where a shift was noted in the quantitative contribution of each cytokine to the total cytokine response by immunocompetent cells to a stimulus by life and killed cells of sensitive, resistant and revertant *E. coli* cultures (Figure 7).

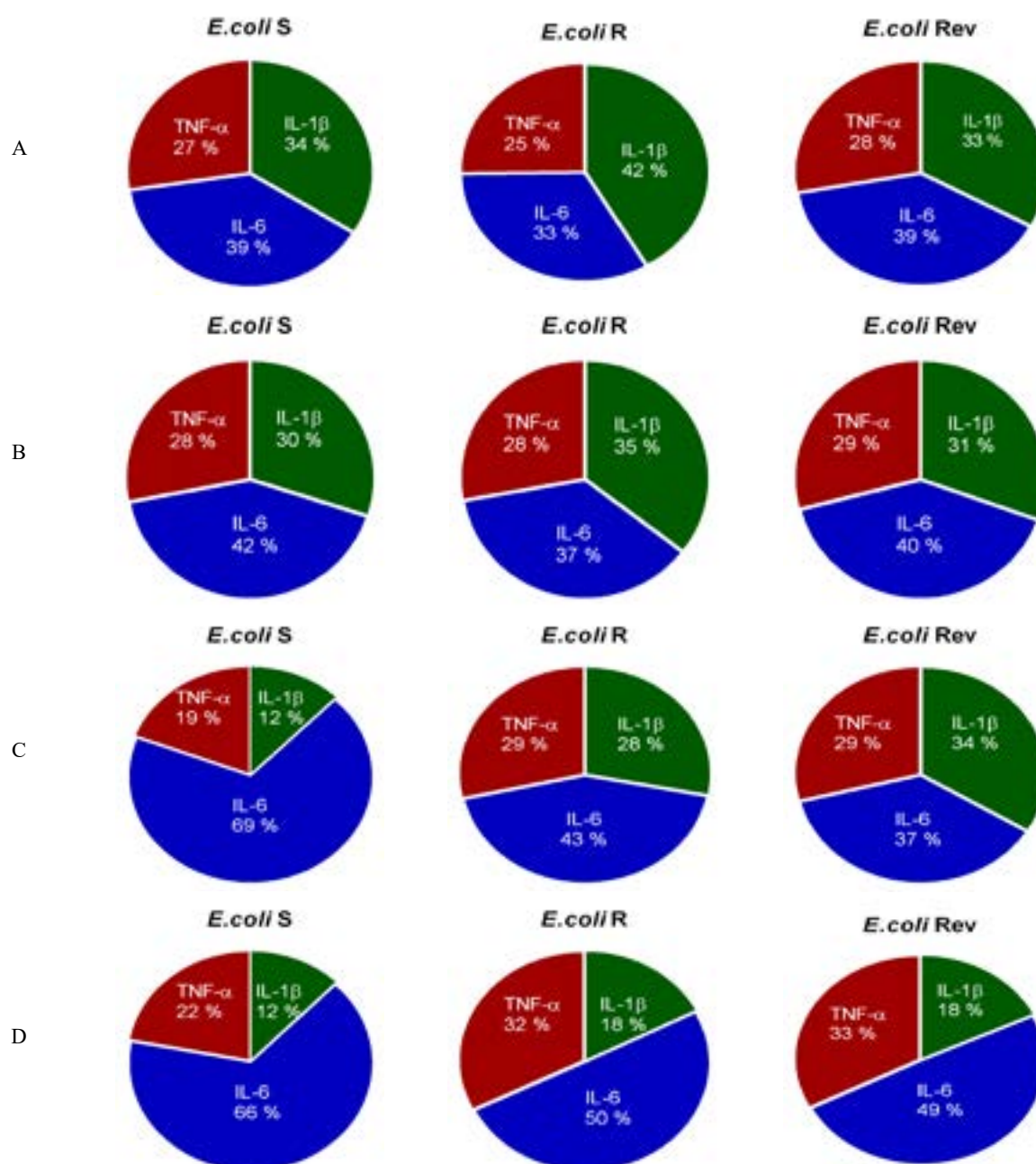


Figure 7 – Orchestration of cytokines (A) PBMC to live cells, (B) MON to live cells, (C) PBMC to fixed cells, (D) MON to fixed *E. coli* cells

It should be noted that both mononuclear cells and monocytes reacted to stimulation by living cells of sensitive *E. coli* S with emission of ~30 % (IL-1 β): ~40 % (IL-6): ~30 % (TNF- α), to non-viable cells of this culture, a more anti-inflammatory response was obtained. Whereas the cytokine response obtained by immunocompetent cells to a stimulus by fixed *E. coli* R and *E. coli* Rev cells are characteristic of inflammasome inflammation.

Such a change in the levels of early mediators of the acute phase response may indicate a differential response of cellular receptors and signalling pathways of immunocompetent cells to antibiotic-resistant and sensitive bacteria.

The orchestration of the cytokine response is probably associated with the mechanisms of induction and the features of the regulation of signalling pathways. As is known, the effective and sustained action of proinflammatory cytokines depends on synergism with other cytokines and antagonism of opposing cytokines, which are often highly expressed in inflammatory foci [30].

Conclusion

Thus, the relationship between antibiotic sensitivity and the cytokine-inducing potential of *E. coli* has been studied. When studying the cellular mechanisms of induction of an innate immune response to archival living and fixed cells of sensitive and resistant strains, as well as the revertant subculture of *E. coli*, a difference in the immunogenicity of PAMP and vitaPAMP structures

of test cultures was revealed. It has been shown that in response to fixed cultures of *E. coli* S and *E. coli* R, there is a decrease in the threshold level of IL-1 β , IL-6 and TNF- α production, both in PBMC and in monocytes, compared to the level of cytokine production, induced by live bacteria. Whereas fixed cells of revertant *E. coli* caused a higher production of proinflammatory cytokines PBMC than living cells of this culture.

Conflict of interest

All authors have read and are familiar with the content of the article and have no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank the head of the Microbiology Department of the Scientific Center for Anti-Infectious Drugs (Almaty, Kazakhstan), Ardak B. Jumagazyeva, and the staff members of the Microbiology Department for maintaining the model microorganisms received from the ATCC and keeping them readily available for this study. As well as employees of the laboratory of immunology who took part in this study.

Funding

All experimental procedures and publication expenses were funded by the grant BR09458960 provided by the Industrial Development Committee of the Ministry of Industry and Infrastructure Development of the Republic of Kazakhstan.

References

- 1 Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance // Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 52. – P.11-17.
- 2 Pamer E.G. Immune responses to commensal and environmental microbes // Nat. Immunol. – 2007. – Vol. 8. – P. 1173-1178.
- 3 Happel K.I., Bagby G.J., Nelson S. Host defense and bacterial pneumonia // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2004. – Vol. 25, No 1. – P. 43-52.
- 4 Mueller M., de la Pena A., Derendorf H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 48, No 2. – P. 369-377.
- 5 DeRyke C.A., Lee S.Y., Kuti J.L., Nicolau D.P. Optimising dosing strategies of antibacterials utilising pharmacodynamic principles: impact on the development of resistance // Drugs. – 2006. – Vol. 66, No 1. – P. 1-14.
- 6 Ambrose P.G., Bhavnani S.M., Rubino C.M., Louie A., Gumbo T., Forrest A. et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 44, No 1. – P. 79-86.
- 7 Zhao X., Drlica K. A unified anti-mutant dosing strategy // Antimicrob. Chemother. – 2008. – Vol. 62, No 3. – P. 434-436.
- 8 Jumbe N., Louie A., Leary R., Liu W., Deziel M.R., Tam V.H. et al. Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy // Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112, No 2. – P. 275-285.
- 9 Drlica K., Zhao X.L. Is 'dosing-to-cure' appropriate in the face of antimicrobial resistance? // Rev. Med. Microbiol. – 2004. – Vol. 15, No 2. – P. 73-80.

- 10 Tumbarello M. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – Vol. 51, No 6. – P. 1987-1994.
- 11 Kumarasamy K.K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study // Lancet Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10, No 9. – P. 597-602.
- 12 Fleming A. Penicillin. Nobel Lectures. <https://www.nobelprize.org/?p=12848&pagespeed=noscript?pagespeed=noscript>. 11.08.2021.
- 13 World Health Organization 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf. 11.08.2021.
- 14 Cotroneo N., Rubio A., Critchley I.A., Pillar C., Pucci M.J. In vitro and in vivo characterization of tebipenem, an oral carbapenem // Antimicrob. Agents Chemother. – 2020. – Vol. 64, No 8.
- 15 Zhang D., Chen J., Jing Q., Chen Z., Ullah A., Jiang L., Zheng K., Yuan C. and Huang M. Development of a Potent Antimicrobial Peptide With Photodynamic Activity // Front. Microbiol. – 2021. – Vol. 12.
- 16 Volodina G.V., Davtyan T.K., Kulmanov M.E., Dzhumagazieva A.B., Tursunova S.K., Abekova A.O. et al. The effect of antibiotic-resistant and sensitive *Escherichia coli* on the production of pro-inflammatory cytokine response by human peripheral blood mononuclear cells // J. Clin. Cell Immunol. – 2017. – Vol. 8, No 522.
- 17 Korotetskiy I.S., Joubert M., Taukobong S. et al. Complete Genome Sequence of a Multidrug-Resistant Strain, *Escherichia coli* ATCC BAA-196, as a Model for Studying Induced Antibiotic Resistance Reversion // Microbiol. Resour. Announc. – 2020. – Vol. 9, No 50.
- 18 Mourao-Sa D., Roy S., Blander J.M. Vita-PAMPs: signatures of microbial viability // Adv. Exp. Med. Biol. – 2013. – Vol. 785. – P. 1-8.
- 19 Schnare M., Barton G.M., Holt A.C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses // Nat. Immunol. – 2001. – Vol. 2. – P. 947-950.
- 20 Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity // Immunity. – 2011. – Vol. 34. – P. 637-650.
- 21 Akira S., Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family // Immunol. Lett. – 2003. – Vol. 85. – P. 85-95.
- 22 Granucci F., Feau S., Zanoni I., Pavelka N., Vizzardelli C., Raimondi G. et al. The immune response is initiated by dendritic cells via interaction with microorganisms and interleukin-2 production // J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 187. – P. 346-350.
- 23 Sharpe A.H. Mechanisms of costimulation // Immunol. Rev. – 2009. – Vol. 229. – P. 5-11.
- 24 Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response // Nature. – 2007. – Vol. 449. – P. 819-826.
- 25 Blander J.M., Sander L.E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat // Nature Rev. Immunology. – 2012. – Vol. 12. – P. 215-225.
- 26 Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // Cell. – 2006. – Vol. 124. – P. 783-801.
- 27 Koenig C.H., Finger H., Hof H. Failure of killed *Listeria monocytogenes* vaccine to produce protective immunity // Nature. – 1982. – Vol. 297. – P. 233-234.
- 28 Detmer A., Glenting J. Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards // Microbiology Cell Fact 5. – 2006. – Vol. 5. – P. 23.
- 29 Sander L.E., Michael J., Mark V. Sensing prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity // Nature. – 2012. – Vol. 474. – P. 385-389.
- 30 Ahmed S.T., Ivashkiv L.B. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and stat activation by inflammatory and stress pathways // Immunol. – 2000. – Vol. 165, No 9. – P. 5227-5237.

References

- 1 Ahmed S.T., Ivashkiv L.B. (2000) Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and stat activation by inflammatory and stress pathways. Immunol., vol. 165, no. 9, pp. 5227-5237.
- 2 Akira S., Hemmi H. (2003) Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol. Lett., vol. 85, pp. 85-95.
- 3 Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. Cell, vol. 124, pp. 783-801.
- 4 Ambrose P.G., Bhavnani S.M., Rubino C.M., Louie A., Gumbo T., Forrest A. et al. (2007) Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. Clin. Infect. Dis., vol. 44, no. 1, pp. 79-86.
- 5 Blander J.M., Sander L.E. (2012) Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. Nature Rev. Immunology, vol. 12, pp. 215-225.
- 6 Cotroneo N., Rubio A., Critchley I.A., Pillar C., Pucci M.J. (2020) In vitro and in vivo characterization of tebipenem, an oral carbapenem. Antimicrob. Agents Chemother., vol. 64, no. 8.
- 7 DeRyke C.A., Lee S.Y., Kuti J.L., Nicolau D.P. (2006) Optimising dosing strategies of antibacterials utilising pharmacodynamic principles: impact on the development of resistance. Drugs, vol. 66, no. 1, pp. 1-14.
- 8 Detmer A., Glenting J. (2006) Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. Microbiology Cell Fact 5, vol. 5, pp. 23.

- 9 Drlica K. (2003) The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, pp. 11-17.
- 10 Drlica K., Zhao X.L. (2004) Is 'dosing-to-cure' appropriate in the face of antimicrobial resistance? *Rev. Med. Microbiol.*, vol. 15, no. 2, pp. 73-80.
- 11 Fleming A. Penicillin. Nobel Lectures. <https://www.nobelprize.org/?p=12848&pagespeed=noscript?pagespeed=noscript>. 11.08.2021.
- 12 Granucci F., Feau S., Zanoni I., Pavelka N., Vizzardelli C., Raimondi G. et al. (2003) The immune response is initiated by dendritic cells via interaction with microorganisms and interleukin-2 production. *J. Infect. Dis.*, vol. 187, pp. 346-350.
- 13 Happel K.I., Bagby G.J., Nelson S. (2004) Host defense and bacterial pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 25, no. 1, pp. 43-52.
- 14 Jumbe N., Louie A., Leary R., Liu W., Deziel M.R., Tam V.H. et al. (2003) Application of a mathematical model to prevent in vivo amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *Clin. Invest.*, vol. 112, no. 2, pp. 275-285.
- 15 Kawai T., Akira S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, vol. 34, pp. 637-650.
- 16 Koenig C.H., Finger H., Hof H. (1982) Failure of killed *Listeria monocytogenes* vaccine to produce protective immunity. *Nature*, vol. 297, pp. 233-234.
- 17 Korotetskiy I.S., Joubert M., Taukobong S. et al. (2020) Complete Genome Sequence of a Multidrug-Resistant Strain, *Escherichia coli* ATCC BAA-196, as a Model for Studying Induced Antibiotic Resistance Reversion. *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 9, no. 50.
- 18 Kumarasamy K.K. et al. (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.*, vol. 10, no. 9, pp. 597-602.
- 19 Medzhitov R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, vol. 449, pp. 819-826.
- 20 Mourao-Sa D., Roy S., Blander J.M. (2013) Vita-PAMPs: signatures of microbial viability. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 785, pp. 1-8.
- 21 Mueller M., de la Pena A., Derendorf H. (2004) Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 2, pp. 369-377.
- 22 Pamer E.G. (2007) Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat. Immunol.*, vol. 8, pp. 1173-1178.
- 23 Sander L.E., Michael J., Mark V. (2012) Sensing prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, vol. 474, pp. 385-389.
- 24 Schnare M., Barton G.M., Holt A.C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, vol. 2, pp. 947-950.
- 25 Sharpe A.H. (2009) Mechanisms of costimulation. *Immunol. Rev.*, vol. 229, pp. 5-11.
- 26 Tumbarello M. et al. (2007) Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 6, pp. 1987-1994.
- 27 Volodina G.V., Davtyan T.K., Kulmanov M.E., Dzhumagazieva A.B., Tursunova S.K., Abekova A.O. et al. (2017) The effect of antibiotic-resistant and sensitive *Escherichia coli* on the production of pro-inflammatory cytokine response by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Cell Immunol.*, vol. 8, no. 522.
- 28 World Health Organization 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf. 11.08.2021.
- 29 Zhang D, Chen J, Jing Q, Chen Z, Ullah A, Jiang L, Zheng K, Yuan C and Huang M (2021) Development of a Potent Antimicrobial Peptide With Photodynamic Activity. *Front. Microbiol.*, vol. 12.
- 30 Zhao X., Drlica K. (2008) A unified anti-mutant dosing strategy. *Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, no. 3, pp. 434-436.

3-бөлім
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

Section 3
**MOLECULAR
BIOLOGY AND GENETICS**

Раздел 3
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

МРНТИ 34.15.23

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v92.i3.07>

Ж.К. Жунусбаева¹ , Н.Ж. Омирбекова¹ , Б.О. Бекманов² ,
Д.О. Мынбаева^{1*} , М.Е. Естаева¹ , А.Е. Ержан¹ ,
А.Б. Рысбекова³ , А.И. Жусупова¹ , Ш.М. Ыргынбаева 

¹ НАО Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

² РГП «Институт генетики и физиологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

³ НАО Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Казахстан, г. Нур-Султан

*e-mail: dana_1206@mail.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В СОРТАХ МЯГКОЙ И ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ

Буря или листовая ржавчина является одной из наиболее вредоносных болезней пшеницы, возбудителем которой является грибок *Puccinia triticina*, относящийся к семейству Pucciniaceae. Она может привести к потерям урожая, а также к снижению качества зерна. Устойчивость к бурой ржавчине мягкой и твердой пшеницы является предпосылкой для получения стабильно высоких урожаев. Материалом исследований служили 11 образцов (отечественные и российские). С целью изучения устойчивости пшеницы к бурой ржавчине были выбраны 7 генов – Lr9, Lr10, Lr14, Lr22a, Lr28, Lr34 и Lr67. На основе результатов молекулярного скрининга было установлено, что сорта мягкой пшеницы несут в своих геномах гены Lr10, Lr22a, Lr34 а также Lr67 и являются носителями как эффективных, так и неэффективных генов устойчивости. Маркер, сцепленный с геном Lr9, был идентифицирован лишь у контрольного образца Новосибирская 29, что указывает на отсутствие данного гена у материалов твердой пшеницы. Но образцы *T. durum* защищены генами Lr10, Lr14 и высокоэффективным геном Lr28. Сорта пшениц, у которых были амплифицированы гены устойчивости к бурой ржавчине, могут быть пирамидированы с другими генами устойчивости к листовым болезням и успешно применяться в соответствующих селекционных программах.

Ключевые слова: мягкая и твердая пшеница, устойчивость, Lr-гены, STS, SSR, бурая ржавчина.

Zh.K. Zhunusbayeva¹, N.Zh. Omirbekova¹,
B.O. Bekmanov², D.O. Mynbayeva^{1*}, M.Y. Yestayeva¹,
A.Y. Yerzhan¹, A.B. Rysbekova³, A.I. Zhussupova¹, Sh.M. Yrgynbayeva¹

¹ NJSC Kazakh National University named after Al-Farabi, Kazakhstan, Almaty

² RSE «Institute of Genetics and Physiology» CS MES RK, Kazakhstan, Almaty

³ NAO Kazakh Agrotechnical University named after S. Seifullin, Kazakhstan, Nur-Sultan

*e-mail: dana_1206@mail.ru

Detection of carriers of resistance genes to leaf rust using molecular genetic analysis in varieties of soft and durum wheat

Brown or leaf rust is one of the devastating wheat diseases, caused by the fungus *Puccinia triticina* Pucciniaceae family, which can lead to crop losses and also to deterioration of grain quality. The brown rust resistance of soft and durum wheat is a prerequisite for consistently high yields. Eleven samples (of local and Russian selection) were used as a research material. In order to study wheat resistance to leaf rust, seven genes were selected – Lr9, Lr10, Lr14, Lr22a, Lr28, Lr34, and Lr67. Based on the results of the molecular screening, it was found that both soft and durum wheat varieties have Lr10, Lr22a, Lr34 and Lr67 genes in their genomes and are carriers of both effective and ineffective resistance genes. The marker linked to the Lr9 gene was identified only in the control sample Novosibirskaya 29, which indicates the absence of this gene in durum wheat materials. Even so durum wheat samples are protected by genes Lr10, Lr14 and highly efficient gene Lr28. Wheat varieties in which resistance genes have been amplified can be pyramided with other resistance genes and successfully used in appropriate breeding programs.

Key words: soft and durum wheat, resistance, Lr-genes, STS, SSR, brown rust.

Ж.К. Жунусбаева¹, Н.Ж. Омирбекова¹,
Б.О. Бекманов², Д.О. Мынбаева^{1*}, М.Е. Естаева¹,
А.Е. Ержан¹, А.Б. Рысбекова³, А.И. Жусупова¹, Ш.М. Ыргынбаева¹

¹«Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті» КеАҚ, Қазақстан, Алматы қ.

²«Генетика және физиология институты» РМК ҚР ҒБМ ҒК, Қазақстан, Алматы қ.

³«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» КеАҚ, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

*e-mail: dana_1206@mail.ru

Жұмсақ және қатты бидай сорттарында молекулалық-генетикалық талдау көмегімен қоңыр татқа төзімді ген тасымалдаушыларды анықтау

Қоңыр немесе жапырақ таты бидай дақылының зиянды ауруларының бірі болып табылады. Ауру қоздырушысы *Puccinia* туысына жататын саңырауқұлақ *Puccinia trititica*, өнімділіктің және дән сапасының төмендеуіне алып келеді. Жұмсақ және қатты бидайдың қоңыр татқа төзімділігі үнемі жоғары өнімділіктің алғышарты болып табылады. Зерттеу материалы ретінде жұмсақ және қатты бидайдың 11 үлгісі (отандық және шетелдік) пайдаланылды. Бидайдың жапырақ татына төзімділігін зерттеу үшін 7 ген – Lr9, Lr10, Lr14, Lr22a, Lr28, Lr34 және Lr67 таңдалды. Молекулалық скринингтің нәтижелері бойынша жұмсақ және қатты бидай сорттары геномында Lr10, Lr22a, Lr34 және Lr67 гендерін алып жүретіндігі және тиімді де, тиімсіз де тұрақтылық гендерінің тасымалдаушысы екендігі анықталды. Lr9 генімен тіркескен маркер Новосибирская 29 бақылау үлгісінде ғана анықталды, бұл қатты бидай материалдарында бұл геннің жоқтығын көрсетеді. Алайда *T. durum* үлгілері Lr10, Lr14 гендерімен және жоғары тиімді Lr28 генімен қорғалған. Жапырақ татына қарсы төзімділік гендері анықталған бидай сорттары жапырақ татына төзімділік танытатын басқа ген тасымалдаушы үлгілермен будандастыруға (пирамидирование) болады және тиісті селекциялық жобаларда қолданыла алады.

Түйін сөздер: жұмсақ және қатты бидай, төзімділік, Lr-гендер, STS, SSR, қоңыр тат.

Введение

В современном мире продовольственная безопасность является одной из значимых проблем многих государств. По оценке экспертов Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (FAO), общим показателем национальной безопасности любой страны служит производство зерна, в развитых странах этот показатель составляет 900-1000 кг на 1 человека. Согласно данным FAO, в 2014 году мировое производство пшеницы составляло 729 млн. тонн, к 2024 году будет увеличено до 788 млн. тонн [1].

Пшеница – это национальный бренд Казахстана, который обеспечивает продовольственную безопасность нашей страны, как основное злаковое зерно и экспортно-ориентировочный продукт. Более одной трети урожая ежегодно направляется в зарубежные страны. Наибольший процент зерна отправляется в ближние с Казахстаном, страны СНГ. Также в список основных государств импортирующих наше зерно и муку входят США, Австралия, Канада страны Европейского Союза, Ближнего Востока и Северной Африки [2-3].

Основным биологическим фактором, сдерживающим производство пшеницы и лимити-

рующим получение высоких урожаев является недостаточная устойчивость сортов пшеницы к различным заболеваниям. Именно поэтому защита посевов от различных патогенов и усиление работы в этом направлении одна из основных задач, стоящих перед селекционерами и генетиками страны.

Ржавчинные грибы являются одними из наиболее распространенных патогенов растений и вызывают серьезные заболевания зерновых культур. Они могут быть широко распространены на обширных географических территориях с помощью переносимых ветром базидиоспор, эциоспор и урединиоспор и часто сильно генетически разнообразны по расам или патотипам, различающимся вирулентностью / авирулентностью по отношению к разным генотипам хозяев. Поэтому устойчивость к ржавчине – совокупность сложных признаков, основанных на многих независимых или взаимосвязанных генетических факторах.

Одним из вредоносных грибов, порождающих ржавчинную болезнь является *Puccinia trititica* Eriks. (Pt). Патоген вызывает бурую или листовую ржавчину пшеницы, тем самым повлекая серьезные потери во всех регионах мира, где выращивают пшеницу, в том числе и в Казахстане.

Ежегодные потери урожая пшеницы из-за бурой ржавчины достигают 3,5% и 4,5%, если эпидемия развивается рано и инфекция сохраняется до полного созревания зерна, потери увеличиваются до 40-60%. Согласно статистике FAO, потери урожая из-за болезни во всем мире составляют около 10% от основных продовольственных культур [4-5].

Как было выше сказано в природе индивидуальная популяция *Puccinia triticina* состоит из многих физиологических рас с разным уровнем вирулентности. Отчасти это связано с переносимостью грибка по воздуху, а отчасти с мутацией или отбором. Это позволяет грибку развивать вирулентность по отношению к сортам, которые, по-видимому, несут одну или больше генов устойчивости (R) к наиболее распространенным расам грибов в различных регионах [11].

Наиболее эффективным, экономичным и экологически безопасным методом борьбы с болезнью считается использование генетически устойчивых сортов. Описано более 80 генов устойчивости к бурой ржавчине, не только из пшеницы, но и из родственных видов, которые были введены в геном пшеницы с помощью различных методологий [6]. Введение в сорта пшеницы генов устойчивости к листовой ржавчине (генов *Lr*) – лучший способ их защиты с точки зрения экологической безопасности [7]. Но многие из них потеряли свою эффективность в борьбе против возбудителя листовой ржавчины.

Широкое использование сортов пшеницы с разными генами устойчивости к листовой ржавчине привело к тому, что в основных регионах выращивания пшеницы обнаруживаются все более разные и намного устойчивые расы листовой ржавчины. При этом потребность в зерне, как к одному из главных злаковых и источнику сырья для биотоплива только увеличивается. Поэтому внедрение и использование различных биотехнологических подходов с применением молекулярных методов наряду с традиционным гибридологическим анализом и фитопатологическим тестированием может помочь ускорить и облегчить процесс селекционных программ по устойчивости к бурой ржавчине [8].

В связи с постоянной генетической изменчивостью патогена эффективность генов недолговечна, следовательно, необходимо постоянное

изучение состава популяции патогенов в районе возделывания культуры, а также необходим постоянный поиск новых генов устойчивости, пригодных для селекции пшеницы.

Цель исследования – провести идентификацию генов *Lr* к листовой ржавчине сортов мягкой и твердой пшеницы с применением молекулярно-генетического метода.

Методы и материалы

Для выявления генов *Lr* были использованы 11 сортов мягкой озимой и твердой яровой пшеницы и выбраны 7 специфических маркеров. Исследования проводились в лаборатории молекулярной генетики Научно-исследовательского Института Генетики и Физиологии. Образцы были предоставлены лабораторией «Генетики и селекции растений», факультета биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, а также Казахским агротехническим университетом им. С.Сейфуллина.

Экстракцию геномного ДНК из 7-дневных проростков проводили с помощью модифицированного СТАВ-метода (Riede & Anderson). При выборе *Lr* генов для исследования учитывался уровень устойчивости к *Puccinia triticina* Eriks. (Pt), а также их локализация в геномах мягкой и твердой пшениц. Идентификацию генов осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, маркирующими отдельные гены *Lr*. Праймеры были отобраны на основании данных литературных источников. Нуклеотидные последовательности данных праймеров представлены в таблице 1.

Амплификация проводилась в амплификаторе Master cycler nexus gradient Eppendorf (Германия). Программы амплификации были выбраны в соответствии с каждым исследуемым геном устойчивости. Используемые ПЦР-программы представлены в таблице 2.

Продукты амплификации разделяли с использованием электрофореза в 1,4% агарозном геле в 1хTBE. Гели окрашивали и документировали в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документации Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера для оценки молекулярной массы амплифицированных фрагментов ючл применен ДНК-маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder (ThermoFisherScientific, США).

Таблица 1 – Характеристика праймеров, использованных для идентификации Lr генов

Lr-гены	Название маркера	Тип маркера	Локализация	Последовательность, 5'→3'
Для мягкой озимой пшеницы				
<i>Lr10</i>	FL2245lr10-6/r2	STS	1AS	GTG TAA TGC ATG CAG GTT CC AGG TGT GAG TGA GTT ATG TT
<i>Lr22a</i>	WMS296	SSR	2DS	AAT TCA ACC TAC CAA TCT CTG GCC TAA TAA ACT GAA AAC GAG
<i>Lr34</i>	csLV34	STS	7DS	GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT
<i>Lr67</i>	Xcfd23-4D	CFD	4D	CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC
Для твердой яровой пшеницы				
<i>Lr9</i>	J13/1	SCAR	6BL	TCC TTT TAT TCC GCA CGC CGG CCA CAC TAC CCC AAA GAG ACG
<i>Lr10</i>	FL2245lr10-6/r2	STS	1AS	GTG TAA TGC ATG CAG GTT CC AGG TGT GAG TGA GTT ATG TT
<i>Lr14</i>	Xqwm344	SSR	7BL	CAA GGA AAT AGG CGG TAA CT ATT TGA GTC TGA AGT TTG CA
<i>Lr28</i>	Lr28	STS	4AL	CCC GGC ATA AGT CTA TGG TT CAA TGA ATG AGA TAC GTG AA

Таблица 2 – Условия проведения реакции амплификации

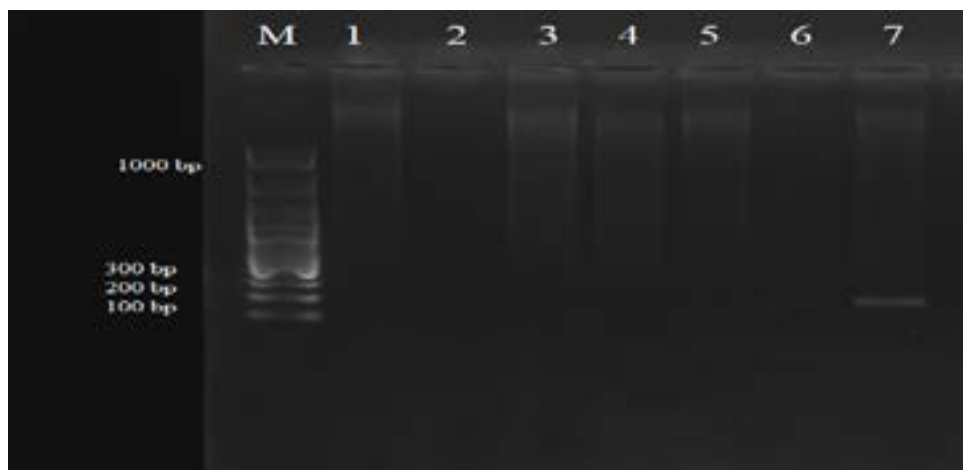
Lr Гены	Начальная де- натурация, °C (мин)	Количество циклов	Денатурация °C (сек)	Отжиг, °C (сек)	Экстенция, °C (сек)	Последняя экс- тенция °C (мин)
<i>Lr10</i>	94 (3)	35	94 (60)	58 (60)	72 (120)	72 (5)
<i>Lr22a</i>	94 (2)	30	94 (60)	55 (60)	73 (50)	73 (5)
<i>Lr34</i>	94 (10)	30	94 (30)	60 (30)	72 (30)	72 (7)
<i>Lr67</i>	94 (2)	30	95 (60)	60 (60)	72 (60)	73 (5)
<i>Lr9</i>	94 (5)	35	92 (60)	58 (60)	72 (120)	72 (5)
<i>Lr14</i>	94 (3)	45	94 (60)	55 (60)	72 (120)	72 (10)
<i>Lr28</i>	94(6)	35	94 (60)	55 (60)	72 (60)	72 (5)

Результаты исследования и их обсуждение

Континентальный и влажный климат юго-восточных и северных регионов Казахстана создает идеальные условия для развития бурой ржавчины, именно по этой причине выявление генов устойчивости *Lr* у исследуемых сортов пшеницы является важным для будущих селекционных программ. С каждым годом появляются новые расы возбудителей бурой ржавчины. В результате, многие гены устойчивости теряют свою эффективность.

Ниже описаны результаты идентификации *Lr* генов для сортов твердой яровой пшеницы. В качестве контрольного образца был взят сорт мягкой пшеницы Новосибирская 29, который указан на снимках под №7.

При использовании SCAR маркера гена *Lr9* продукт амплификации с молекулярным весом 200 пар нуклеотидов выявлен только у контрольного образца. У остальных сортов пшеницы не идентифицировано характерных фрагментов, что позволяет заключить об отсутствии этого гена у изучаемых образцов (рисунок 1).



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, ThermoFisherScientific, США).
1 – Корона; 2 – Лавина; 3 – Дамсинская 90; 4 – Дамсинская 2017;
5 – Дамсинская юбилейная; 6 – Дамсинская янтарь; 7 – Новосибирская 29 (контроль).

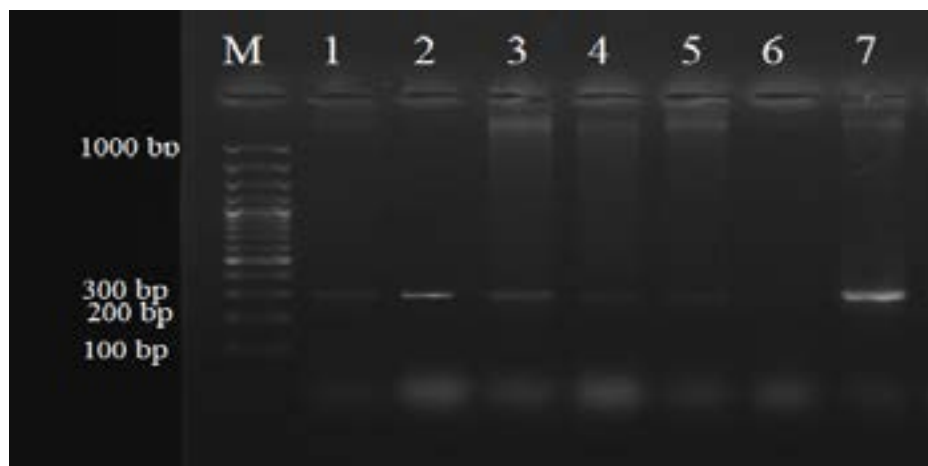
Рисунок 1 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr9*

Ген *Lr9*, локализованный на длинном плече хромосомы 6В, это один из наиболее эффективных генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине. Он перенесен в геном пшеницы от *Aegilops umbellulata*. В 2004-2005 г.г. было установлено, что *Lr9* имеет высокую эффективность к природной популяции *Puccinia recondita* [14]

Первые сорта с *Lr9* созданы в 60–70-х гг. прошлого столетия в США. Ген *Lr9* массово включали в селекционные программы во многих странах. 2014 г. Гульятеева Е.И. и др. исследовали коллекцию изолятов возбудителя бурой ржавчины сортов пшеницы в Северном Казахстане. Инфекционный материал собирали с сортов твердой пшеницы Дамсинская 90 и Харьковская 9 в Шортандинской области. Все изученные изоляты были авирулентными по отношению к генам *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* [12, 13]. Тем не менее полученные результаты показали отсутствие этого гена у исследуемых твердых сортов пшеницы. До недавнего времени ген *Lr9* относился к группе высокоэффективных во всем мире. Выращивание сортов с ним предопределило появление вирулентных изолятов гриба, которые впервые были отмечены в США в 1971 г., спустя четыре года с начала массового возделывания. В настоящее время вирулентность к гену *Lr9* отмечается как в регионах выращивания сортов с этим геном, так и за их пределами. По данным Гульятеевой и др. соавторов большинство российских и ка-

захстанских изолятов *P. triticina*, вирулентны к линиям с генами *Lr9* или *Lr19*, также к *Lr1*, *Lr3* и *Lr10*. Поэтому чтобы сохранить эффективность в сельском хозяйстве, ген *Lr9* необходимо комбинировать и пирамидировать с другими эффективными и частично эффективными генами устойчивости. Таким примером является сочетание генов *Lr9* с геном *Lr26* или геном устойчивости взрослых растений *Lr37* [15]. Также сообщалось, что комбинация *Lr9* с геном *Lr24* приводит к высоким уровням устойчивости к листовой ржавчине.

Lr10 является одним из первых клонированных генов устойчивости, кодируемых белком типа CC-NBS-LRR. В большинстве случаев для идентификации этого гена использует молекулярный маркер, созданный Schachermayer et al. (1997) [21]. В настоящее время из-за появления вирулентных изолятов гриба и потери эффективности гена, *Lr10* обнаружен во многих сортах пшеницы. Следовательно, источники гена *Lr10*, идентифицированные в этом исследовании, можно рассматривать для использования в качестве родительской линии при селекции на слияние с другими эффективными генами *Lr* в Казахстане. Для детекции гена в исследовании применялся маркер специфический праймер *Lr10* FI.2245lr10-6/r2. В результате амплификации у всех образцов кроме сорта Дамсинская янтарная был выявлен фрагмент с длиной 300 п.н. (Рисунок 2)



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, ThermoFisherScientific, США).
 1 – Корона; 2 – Лавина; 3 – Дамсинская 90; 4 – Дамсинская 2017;
 5 – Дамсинская юбилейная; 6 – Дамсинская янтарная; 7 – Новосибирская 29 (контроль)

Рисунок 2 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr10*

Отечественные исследователи Кохметова А., Маденова А., Уразалиев Р. и т.д. в 2012–2014 годах в совместном исследовании с Венгерской некоммерческой организацией по исследованию зерна и Международным центром по улучшению качества кукурузы и пшеницы в Турции (CIMMYT) также использовали праймеры F1.2245 и Lr10-6 / r2 для идентификации гена *Lr10* у широко используемых сортов и в ведущих линиях пшеницы в Казахстане [16].

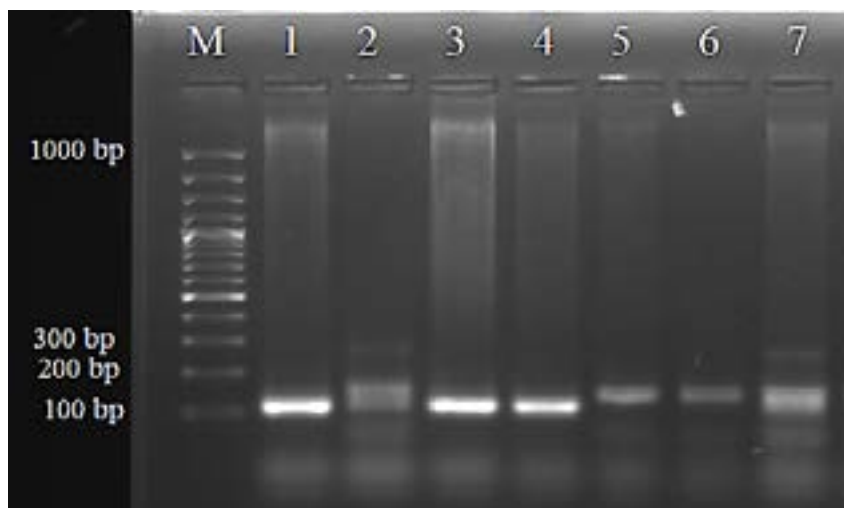
Lr14 один из наиболее эффективных генов устойчивости твердой и мягкой пшеницы. Согласно цитогенетическому анализу, гены устойчивости к бурой ржавчине пшеницы *Lr14* расположены на длинном плече хромосомы 7В. Считается, что *Lr14* был перенесен в геном пшеницы из *Triticum dicoccum*. Данный ген имеет аллели *Lr14a* и *Lr14b*. Ген *Lr14a* связан с генами устойчивости к стеблевой ржавчине и мучнистой росе *Sr17* и *Pm5* соответственно. По литературным данным, *Lr14* можно рассматривать как один из ценных ген устойчивости к бурой ржавчине в странах, выращивающих твердую пшеницу [17]. В результате исследования длина амплифицированного фрагмента гена *Lr14*, как показано на снимке, составила около 100 и 150 п.н (Рисунок 3). Выбранный маркер позволил выявить характерный фрагмент амплификации у всех сортов пшениц. В научной литера-

туре предполагается, что диапазон этого гена составляет от 100 до 200 п.н.

Ген устойчивости *Lr28* расположен на длинном плече хромосомы 4А. Он транспортирован в геном пшеницы от *Aegilops speltoides* и относится к группе эффективных, защищающих растения пшеницы от поражения бурой ржавчиной в различных регионах мира. Кумар А.А., Рагхавая П. [18] отметили высокую продуктивность сортов и линий, несущих этот ген. *Lr28* описывается как эффективный в Западной Европе, Индии, Пакистане, Китае, России и как неэффективный – в США и Канаде [19].

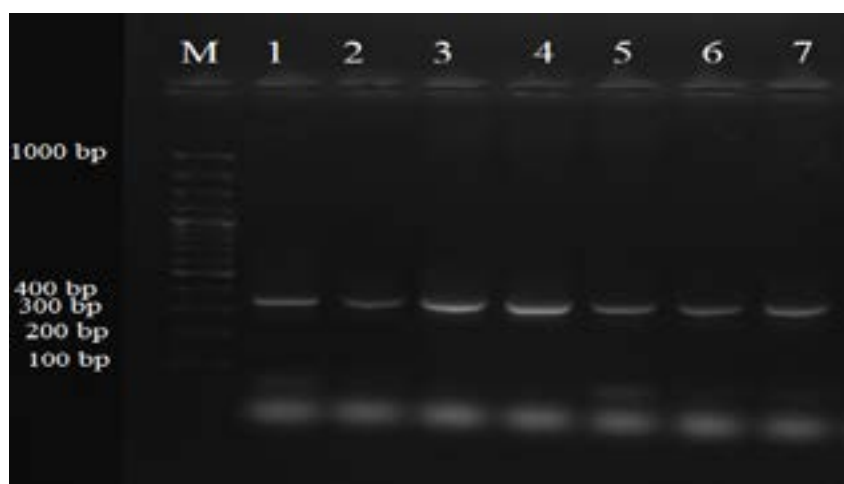
В результате идентификации был выявлен фрагмент имеющий молекулярную массу между 300 и 400 п.н., который показывает что маркерсцепленный с геном *Lr28* амплифицировался у всех семи сортах (Рисунок 4).

Иранские ученые М. Kadkhodaei, А. Dadkhodaie и др. [20] в своих исследованиях идентифицировали ген устойчивости *Lr28* на длине 378 п.н. Ген может быть рекомендован для селекционных программ, направленных на выведение сортов пшеницы, устойчивых к бурой ржавчине. В настоящее время в селекционных программах *Lr28* используют в сочетании с другими генами устойчивости, поскольку в отличие от большинства чужеродных генов, он определяет повышение урожайности и показывает хорошую ржавчиноустойчивость.



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, Thermo Fisher Scientific, США).
1 – Корона; 2 – Лавина; 3 – Дамсинская 90; 4 – Дамсинская 2017; 5 – Дамсинская юбилейная;
6 – Дамсинская янтарная; 7 – Новосибирская 29 (контроль)

Рисунок 3 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr14*



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, Thermo Fisher Scientific, США).
1 – Корона; 2 – Лавина; 3 – Дамсинская 90; 4 – Дамсинская 2017; 5 – Дамсинская юбилейная;
6 – Дамсинская янтарная; 7 – Новосибирская 29 (контроль)

Рисунок 4 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr28*

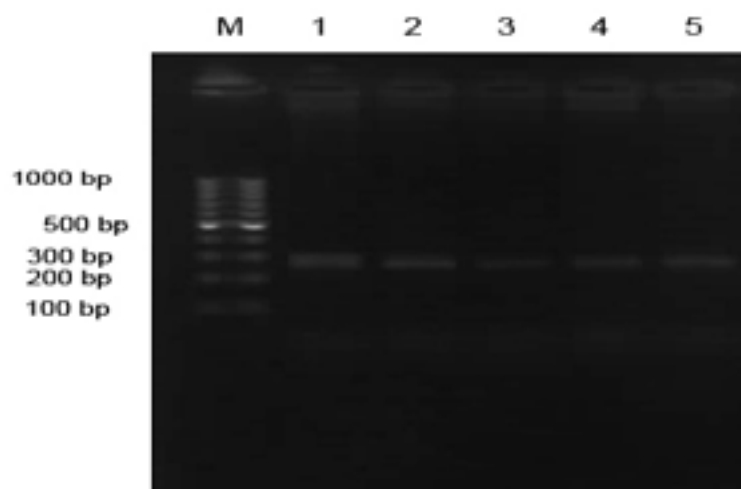
Ген *Lr10* идентифицирован в геноме пшеницы и картирован на коротком плече хромосомы 1A. *Schachermayr* с соавторами впервые выделили этот ген и описали его структуру [21]. Ген *Lr10* получил широкое распространение в сортах пшеницы по всему миру. Он обнаружен во многих австралийских сортах, сортах Северной Америки и линиях, ведущих свое происхождение из селекционных программ Международ-

ного центра улучшения кукурузы и пшеницы (СУММИТ). В связи с быстрым адаптационным процессом вирулентных рас патогена направленный на преодоление эффекта генов устойчивости *Lr10* не является высокоэффективным. По данным исследования CIMMYT показано, что сочетание 4-5 генов устойчивости играет важную роль в комбинации с другими генами устойчивости к бурой ржавчине [22]. В результате

ПЦР-анализа с использованием специфичного для данного гена FL2245lr10-6/r2 STS-маркера, был установлен фрагмент длиной около 290 п.н. Данный фрагмент наблюдался во всех исследованных образцах (Рисунок 5).

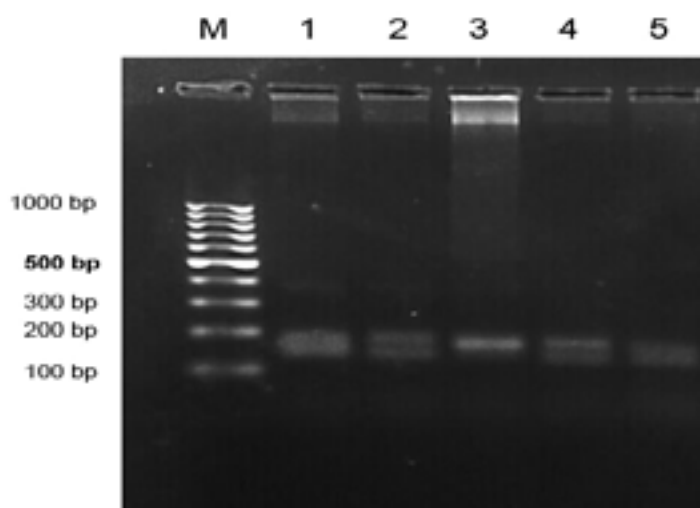
Наличие двух аллелей (а и б) гена возрастной устойчивости к бурой ржавчине *Lr22*, локализованных в хромосоме 2DS, было впервые показано G.G. Rowland и E.R. Kerber [23]. Источником данного гена является *Aegilops tauschii*. Иден-

тификация гена *Lr22a* проводится путем ПЦР с применением SSR маркера WMS296 [10]. Размер фрагмента ДНК *Lr22a* гена колеблется от 120 до 185 п.н. По идентификации данного гена в Казахстане проводилось ограниченное число исследований. Кохметова А.М. с коллегами выявила два фрагмента этого гена с различной длиной. Представленное различие между размерами ДНК фрагмента объясняется тем, что локус *Lr22a* является специфичным у разных сортов (Рисунок 6).



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, Thermo Fisher Scientific, США).
1 – Новосибирская 29; 2 – Казахстанская 19; 3 – Ирень; 4 – Самгау; 5 – Женис

Рисунок 5 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr10*



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, Thermo Fisher Scientific, США).
1 – Новосибирская 29; 2 – Казахстанская 19; 3 – Ирень; 4 – Самгау; 5 – Женис

Рисунок 6 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr22a*

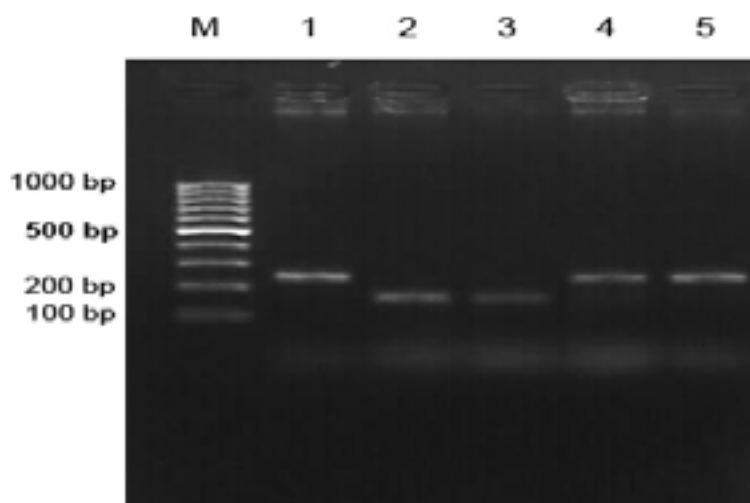
Один из наиболее эффективных генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* широко распространен у коммерческих сортов пшеницы. Экспрессируется он преимущественно в листьях, однако может функционировать и в зародышах [9]. *Lr34* ген относится к группе генов, обеспечивающих устойчивость как качественного, так и количественного проявления. К этой немногочисленной группе генов также относятся *Lr46* и *Lr67*. Комплекс генов *Lr34* и *Lr68* обеспечивает длительную и неспецифическую устойчивость взрослого растения. Важно, что на сегменте хромосомы, содержащем ген *Lr34*, расположены также другие гены устойчивости, в частности, к стеблевой ржавчине (*Yr18*) [25]. Этот локус на хромосоме 7D представляет практический интерес для решения обсуждаемой проблемы у мягкой пшеницы.

В данном исследовании для выявления гена *Lr34* был использован csLV34STS-маркер. Ген локализован в 7DS хромосоме. В результате

ПЦР у сортов выявляются фрагменты разной длины, от 185 до 258 п.н. Сегмент хромосомы, в состав которого входит ген *Lr34*, содержит также ген устойчивости к желтой ржавчине *Yr18*, стеблевой ржавчине, желтой карликовости ячменя *Bdv1* [24]. Этот факт является усилителем ценности данного локуса.

Маркер csLV34 гена *Lr34*, позволяет оценить аллельное состояние в образцах озимой мягкой пшеницы. Наличие доминантного аллеля подтверждается присутствием фрагмента с молекулярным весом 150 п.н., тогда как рецессивного аллеля фрагментом с молекулярным весом 229 п.н. В случае гетерогенности исходного материала на электрофореграмме присутствует оба фрагмента.

Полученные нами результаты (Рисунок 7) свидетельствуют о наличии в исследуемых образцах гена *Lr34* в различных аллельных состояниях: рецессивного у сортов Новосибирская 29, Самгау и Женис, доминантного у сортов Казахстанская 19 и Ирень.

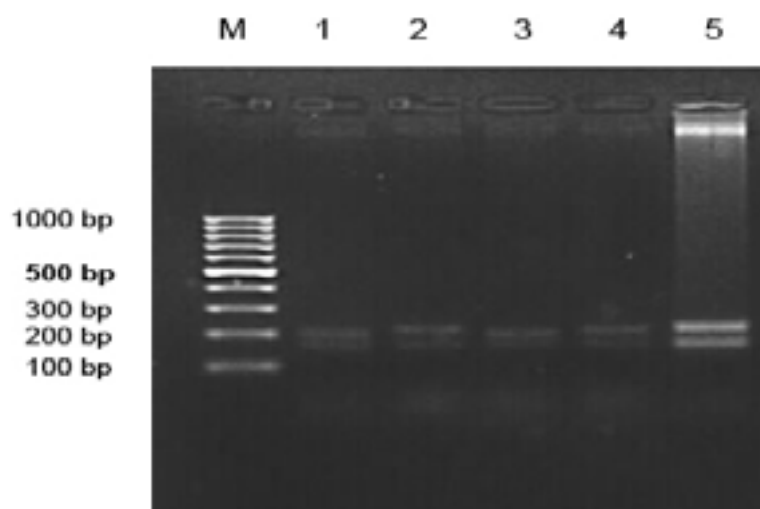


М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, Thermo Fisher Scientific, США).
1 – Новосибирская 29; 2 – Казахстанская 19; 3 – Ирень; 4 – Самгау; 5 – Женис

Рисунок 7 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr34*

Ген *Lr67* в комплементарном взаимодействии с другими генами устойчивости обеспечивает полевую устойчивость к *Puccinia recondita* в виде APR гена. Для поиска гена был использован генетический маркер

Xcfd23-4D. Ген *Lr67* локализован в хромосоме 4D. На рисунке 5 представлена электрофореграмма ампликонов, демонстрирующая наличие во всех исследуемых образцах гена *Lr67* (Рисунок 8).



М – молекулярный маркер (GeneRuler 100 bp DNALadder, Thermo Fisher Scientific, США).
1 – Новосибирская 29; 2 – Казахстанская 19; 3 – Ирень; 4 – Самгау; 5 – Женис

Рисунок 8 – Продукты амплификации ДНК гена *Lr67*

Таблица 4 – Наличие или отсутствие семи генов устойчивости к бурой ржавчине в 11 генотипах мягкой и твердой пшеницы

№	Сорта твердой пшеницы	<i>Lr9</i>	<i>Lr10</i>	<i>Lr14</i>	<i>Lr28</i>	№	Сорта мягкой пшеницы	<i>Lr10</i>	<i>Lr22a</i>	<i>Lr34</i>	<i>Lr67</i>
1	Дамсинская 90	-	+	+	+	7	Новосибирская 29	+	+	+	+
2	Дамсинская янтарная	-	+	+	+	8	Казахстанская 19	+	+	+	+
3	Дамсинская юбилейная	-	+	+	+	9	Ирень	+	+	+	+
4	Дамсинская 20-17	-	+	+	+	10	Самгау	+	+	+	+
5	Корона	-	+	+	+	11	Женис	+	+	+	+
6	Лавина	-	+	+	+						

В результате исследования у сортов мягкой пшеницы идентифицированы гены *Lr10*, *Lr22a*, *Lr34*, *Lr67*, в сортах твердой пшеницы дополнительно выявлены гены *Lr10*, *Lr14* и *Lr28*. В свою очередь, маркер, сцепленный с геном *Lr9*, был амплифицирован лишь у сорта Новосибирская 29, взятого в качестве контрольного образца.

Заключение

В результате исследования сортов мягкой и твердой пшениц с применением молекулярного метода были идентифицированы некоторые *Lr* гены. Таким образом сорта мягкой пшеницы Казахстанская 19, Новосибирская 29, Ирень, Самгау, Женис, а также сорта твердой пшеницы Дамсинская 90, Дамсинская янтарная, Дамсинская юбилейная, Дамсинская 20-17, Корона и

Лавина могут быть предложены в качестве доноров генов устойчивости к бурой ржавчине в различных селекционных программах. На основе полученных результатов было установлено, что сорта мягкой пшеницы несут в своих геномах все выбранные для них *Lr* гены и являются носителями как эффективных, так и неэффективных генов устойчивости. В целом идентифицированные гены показывают значительную устойчивость к патогенам бурой ржавчины в условиях южного Казахстана и могут быть пирамидированы с другими генами устойчивости, что позволит долгое время сохранять их значимость для селекционных работ. Результаты молекулярного скрининга в данной работе указывают на отсутствие у материалов твердой пшеницы гена *Lr9*, однако образцы твердой пшеницы защищены генами *Lr10*, *Lr14* и высокоэффективным геном

Lr28. Генетика устойчивости твердой пшеницы к болезням изучена не на таком уровне, как *T. aestivum*, поэтому можно предположить, что геномы твердых сортов могут нести новые либо другие известные гены устойчивости, для которых не были подобраны молекулярные маркеры. Сорта пшеницы, являющиеся устойчивыми на протяжении пяти и более лет, теряют эту способность. Такое явление напрямую связано со способностью патогенных вредителей эволюционировать с высокой скоростью (новые расы, патотипы). В связи с этим появляется необхо-

димость увеличения числа ржавчиноустойчивых сортов. Проведенный анализ демонстрирует значимость проведения генетических скринингов *Lr* генов у используемых доноров и новых сортов пшеницы, а также необходимость использования этой информации при их районировании в регионах с плохим патогенным фоном.

Работа выполнена в РГП «Институт генетики и физиологии» КН МОН РК, лаборатория «Молекулярной генетики». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- 1 Койшыбаев М. Болезни пшеницы / М. Койшыбаев. – Анкара: ФАО, 2018. – 394 с.
- 2 Гриднева Е.Е. Современные тенденции развития рынка пшеницы в Республике Казахстан / Гриднева Е.Е., Калиакпарова Г.Ш., Гусева О.С. // Проблемы агрорынка. – 2018. – 2. – С. 148-154.
- 3 Агапова В.Д. Эффективность ювенильных генов устойчивости к возбудителю бурой ржавчины озимой пшеницы в фазу проростков в условиях юга России / Агапова В.Д., Ваганова О.Ф., Волкова Г.В. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2020. – № 8 (98) Часть 1. – С. 163-167.
- 4 Koishybayev M.K. Genetic study of wheat resistance to leaf rust / Koishybayev M.K., Zhanarbekova A.B., Kokhmetova A.V., Rsaliev Sh.S. // Bulletin of NAS RK. – 2010. – 6. – С. 10-15.
- 5 Койшыбаев М. Особенности распространения особо опасных болезней пшеницы в Казахстане, устойчивость сортов и внутривидовое разнообразие патогенов / Койшыбаев М. // Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней. Теория и практика. – М., Большие Вяземы, 2012. – С.118-126.
- 6 McIntosh, R.A.; Dubcovsky, J.; Rogers, J.M.; Xia, X.; Raupp, W.J. Catalogue of gene symbols for wheat: 2020 supplement. Annu. Wheat Newsl. 2020, 66, 109–128
- 7 Dinh H.X. Molecular genetics of leaf rust resistance in wheat and barley / Dinh H.X., Singh D., Periyannan S., Park R.F., Pourkheirandish M. // Theor. Appl. Genet. – 2020. – 133(7). – P. 2035-2050. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03570-8>.
- 8 Odintsova I.G. Grain Cultivars with Known Disease Resistance Genes in VIR Catalogue of the World Collection / Odintsova I.G., Makarova N.A., Krupnov V.A. – Leningrad, 1988. – P. 12–21.
- 9 Manninger K. Effective Resistance Genes as Sources of Resistance Against Hungarian Wheat Rust / Manninger K. // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2002. – vol. 38, no. 3-4. – P. 153-154.
- 10 Kthiri D. Mapping of Genetic Loci Conferring Resistance to Leaf Rust From Three Globally Resistant Durum Wheat Sources / Kthiri D., Loladze A., N'Diaye A., Nilsen K.T., Walkowiak S., Dreisigacker S., Ammar K., Pozniak C.J. // Front. Plant Sci. – 2019. – 10:1247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01247>.
- 11 Тырышкин Л.Г. Индукция экспрессии генов устойчивости взрослых растений к листовой ржавчине у проростков пшеницы / Тырышкин Л.Г., Курбанова П.М. // Микология и фитопатология. – 2009. – 43(1). – С. 75-80.
- 12 Бабкенова С.А. Мониторинг структуры популяции бурой ржавчины в Акмолинской области / Бабкенова С.А. // Генофонд и селекция. – 2013. – 1. – P. 39–47.
- 13 Gulyaeva E.I. Virulence of Puccinia triticina on Triticum and Aegilops species / Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Goncharov N.P., Akhmetova A., Abdullaev K.M., Belousova M.H., Kosman E. // Australas. Plant Pathol. – 2016. – 45 (2). – P. 155-163. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0395-6>.
- 14 Гультяева Е.И. Генетическая структура популяций Puccinia triticina в России и её изменчивость под влиянием растения-хозяина / Гультяева Е.И.: Диссерт. ВАК РФ 03.02.12. – 2018.
- 15 Тюнин В.А. К 80-летию селекции яровой мягкой пшеницы в Челябинском НИИ сельского хозяйства. Достижения и основные пути развития аграрной науки Южного Урала / Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Бондаренко Н.П. // Сборник научных трудов. – Челябинск, 2017. – С. 133–139.
- 16 Kokhmetova A. Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Wheat Cultivars Produced in Kazakhstan / Kokhmetova A., Madenova A., Kampitova G., Urazaliev R., Yessimbekova M., Morgounov A., Purnhauser L. // Cereal Res. Commun. – 2016. – Vol.44. – P. 240–250. <https://doi.org/10.1556/0806.43.2015.056>.
- 17 Herrera-Foessel S.A. Identification and molecular characterization of leaf rust resistance gene Lr14a in durum wheat / Herrera-Foessel S.A., Singh R.P., Huerta-Espino J., William H.M., Garcia V., Djurle A., Yuen J. // J Plant Dis. – Vol. 92, No. 3. – 2008. – P. 469–473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0469>.
- 18 Kumar A.A. Effect of the leaf rust resistance gene Lr28 on grain yield and bread making quality of wheat / A.A. Kumar, P. Raghavaiah // Plant Breed. – 2004. – Vol. 123. – P. 35–38. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00937.x>.
- 19 Шишкин Н.В. Эффективность генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине в условиях Ростовской области / Н.В. Шишкин, Т.Г. Дерова, Е.И. Гультяева, Е.Л. Шайдаук // Зерновое хозяйство России. – 2019. – С. 69–73

- 20 Kadkhodaei M. Identification of the leaf rust resistance genes Lr9, Lr26, Lr28, Lr34, and Lr35 in a collection of Iranian wheat genotypes using STS and SCAR markers / Kadkhodaei M., Dadkhodaie A. Assad M.T., Heidari B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. // *J Crop Sci Biotechnol.* – 2012. – 15(4). – P. 267–274. <https://doi.org/10.1007/s12892-012-0035-9>.
- 21 Schachermayr G. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene Lr10 in diverse genetic backgrounds / Schachermayr G., Feuillet C., Keller B. // *Mol. Breed.* – 1997. – Vol. 3. – P. 65–74. <https://doi.org/10.1023/A:1009619905909>.
- 22 Singh P. Early Cambrian Trail Archaeonassa from the Sankholi Formation (Tal Group), Nigali Dhar Syncline (Sirmur District), Himachal Pradesh / Singh P., Bhargava O.N., Chaubey R.S., Kishore N., Prasad S.K. // *J Geol Soc India.* – 2015. – Vol. 85. – P. 717–721.
- 23 Liu J.Q. Genetics of Stem Rust Resistance in Wheat Cvs. Pasqua and AC Taber / Liu J.Q., Kolmer J.A. // *Phytopathol.* – 1998. – 88 (2). – P. 171–176. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.2.171.
- 24 Dyck P.L. Aneuploid analysis of a gene for leaf rust resistance derived from the common wheat cultivar / Dyck P.L., Kerber E.R. // *Can J Genet Cytol.* – 1981. – Vol. 23. – P. 405–409. <https://doi.org/10.1139/g81-043>.
- 25 Урбанович О.Ю. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы с использованием молекулярных маркеров / Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. // *Генетика.* – 2006. – Т. 42. – №5. – С. 675–685.

References

- 1 Agapova, V.D., Vaganova, O.F. & Volkova, G.V. (2020). Jeffektivnost' juvenil'nyh genov ustojchivosti k vozbuditelju buroj rzhavchiny ozimoy pshenicy v fazu prorostkov v usloviyah juga Rossii [Efficiency of juvenile genes for resistance to the leaf rust pathogen of winter wheat in the seedling phase in the south of Russia]. *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal – International research journal*, 8, 98, 1, 163–167 [in Russian].
- 2 Babkenova S.A. (2013). Monitoring struktury populjacii buroj rzhavchiny v Akmolinskoj oblasti [Monitoring of the structure of the population of leaf rust in the Akmola region]. *Genofond i selekcija – Gene pool and breeding*, 1, 39–47.
- 3 Dyck P.L., Kerber E.R. (1981) Aneuploid analysis of a gene for leaf rust resistance derived from the common wheat cultivar. *Can J Genet Cytol.*, 23, 405–409. <https://doi.org/10.1139/g81-043>
- 4 Dinh, H.X., Singh, D., Periyannan, S., Park, R.F. & Pourkheirandish, M. (2020). Molecular genetics of leaf rust resistance in wheat and barley. *Theor. Appl. Genet.*, 133(7), 2035–2050. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03570-8>.
- 5 Gulyaeva, E.I., Shaydayuk, E.L., Goncharov, N.P., Akhmetova, A., Abdullaev, K.M., Belousova, M.H., Kosman, E. (2016). Virulence of *Puccinia triticina* on *Triticum* and *Aegilops* species. *Australas. Plant Pathol.*, 45 (2), 155–163. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0395-6>.
- 6 Gulyaeva, E.I. (2018). Geneticheskaja struktura populjacij *Puccinia triticina* v Rossii i ejo izmenchivost' pod vlijaniem rastenija-hozjajina [Genetic structure of *Puccinia triticina* populations in Russia and its variability under the influence of the host plant]. Dissert. VAK RF 03.02.12. – Dissertation VAK RF 03.02.12. [in Russian].
- 7 Gridneva, E.E., Kaliakparova, G.Sh. & Guseva O.S. (2018). Sovremennye tendencii razvitiya rynka pshenicy v Respublike Kazakhstan [Modern trends in the development of the wheat market in the Republic of Kazakhstan]. *Problemy agrorynka – Agricultural market problems*, 2, 148–154 [in Russian].
- 8 Herrera-Foessel, S.A., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., William, H.M., Garcia, V., Djurle, A., Yuen, J. (2008) Herrera-Foessel S.A. Identification and molecular characterization of leaf rust resistance gene Lr14a in durum wheat. 92 (3), 469–473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0469>
- 9 Kadkhodaei M., Dadkhodaie A., Assad M.T., Heidari B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. (2012). Identification of the leaf rust resistance genes Lr9, Lr26, Lr28, Lr34, and Lr35 in a collection of Iranian wheat genotypes using STS and SCAR markers. *Crop Sci Biotechnol.*, 15(4), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s12892-012-0035-9>
- 10 Koishybaev, M. (2018). Bolezni pshenicy [Wheat diseases]. FAO, Ankara, 394 [in Russian].
- 11 Koishybayev, M.K., Zhanarbekova, A.B., Kokhmetova, A.V. & Rsaliev, Sh.S. (2010). Genetic study of wheat resistance to leaf rust. *Bulletin of NAS RK*, 6, 10–15.
- 12 Koishybaev, M. (2012). Osobennosti rasprostraneniya osobo opasnyh boleznej pshenicy v Kazakhstane, ustojchivost' sortov i vnutrividovoe raznoobrazie patogenov [Peculiarities of the spread of especially dangerous wheat diseases in Kazakhstan, resistance of varieties and intraspecific diversity of pathogens]. *Immunogeneticheskaja zashhita sel'skohozjajstvennyh kul'tur ot boleznej. Teorija i praktika – Immunogenetic protection of crops against diseases. Theory and practice*, M., Bol'shie Vjazemy – M., Bolshiye Vyazemy, 118–126 [in Russian].
- 13 Kokhmetova, A., Madenova, A., Kampitova, G., Urzaliyev, R., Yessimbekova, M., Morgounov, A., Purnhauser, L. (2016). Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Wheat Cultivars Produced in Kazakhstan. *Cereal Res. Commun.*, 44, 240–250. <https://doi.org/10.1556/0806.43.2015.056>.
- 14 Kumar A.A., Raghavaiah A. (2004). Effect of the leaf rust resistance gene Lr28 on grain yield and bread making quality of wheat. *Plant Breed.*, 123, 35–38. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00937.x>.
- 15 Kthiri, D., Loladze, A., N'Diaye, A., Nilsen, K.T., Walkowiak, S., Dreisigacker, S., Ammar, K. & Pozniak, C.J. (2019). Mapping of Genetic Loci Conferring Resistance to Leaf Rust From Three Globally Resistant Durum Wheat Sources. *Front. Plant Sci.*, 10:1247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01247>.
- 16 Liu J.Q., Kolmer J.A. (1998) Genetics of Stem Rust Resistance in Wheat Cvs. Pasqua and AC Taber. *Phytopathol.*, 88 (2), 171–176. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.2.171

- 17 Manning, K. (2002). Effective Resistance Genes as Sources of Resistance Against Hungarian Wheat Rust. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 38, 3-4, 153-154.
- 18 McIntosh, R.A.; Dubcovsky, J.; Rogers, J.M.; Xia, X.; Raupp, W.J. Catalogue of gene symbols for wheat: 2020 supplement. *Annu. Wheat Newsl.* 2020, 66, 109–128
- 19 Odintsova, I.G., Makarova, N.A. & Krupnov, V.A. (1988). Grain Cultivars with Known Disease Resistance Genes in VIR Catalogue of the World Collection. Leningrad, 12-21.
- 20 Schachermayr G., Feuillet C., Keller B. (1997). Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene Lr10 in diverse genetic backgrounds. *Mol. Breed.*, 3, 65–74. <https://doi.org/10.1023/A:1009619905909>
- 21 Shishkin N.V. Derova T.G., Gul'tjaeva E.I., Shajdajuk E.L. (2019). Jeffektivnost' genov ustojchivosti pshenicy k buroj rzhavchine v uslovijah Rostovskoj oblasti. *Zernovoe hozjajstvo Rossii*, 69–73 <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2019-62-2-69-73> [in Russian]
- 22 Singh P., Bhargava O.N., Chaubey R.S., Kishore N., Prasad S.K. (2015) Early Cambrian Trail Archaeonassa from the Sankholi Formation (Tal Group), Nigali Dhar Syncline (Sirmur District), Himachal Pradesh. *J Geol Soc India*, 85, 717–721
- 23 Tyryshkin L.G. & Kurbanova P.M. (2009). Indukcija jekspressii genov ustojchivosti vzroslyh rastenij k listovoj rzhavchine u prorostkov pshenicy [Induction of expression of genes for resistance of adult plants to leaf rust in wheat seedlings]. *Mikologija i fitopatologija – Mycology and phytopathology*, 43(1), 75-80 [in Russian].
- 24 Tyunin, V.A., Shreider, E.R., Bondarenko, N.P. (2017). K 80-letiju selekcii jarovoj mjagkoj pshenicy v Cheljabinskom NII sel'skogo hozjajstva. Dostizhenija i osnovnye puti razvitija agrarnoj nauki Juzhnogo Urala [On the occasion of the 80th anniversary of the selection of spring bread wheat at the Chelyabinsk Research Institute of Agriculture. Achievements and main ways of development of agricultural science in the South Urals]. *Sbornik nauchnyh trudov, Cheljabinsk – Collection of scientific papers, Chelyabinsk*, 133–139.
- 25 Urbanovich O.Ju., Malyshev S.V., Dolmatovich T.V., Kartel' N.A. (2006) Sovremennye metody vyjavlenija genov ustojchivosti k gribnym patogenam v genome pshenicy (*Triticum aestivum* L.). *Genetika*, 42(5), 675–685

D.K. Kamalova^{1,4*}, **M.Zh. Zhurinov²**, **G.A. Tasanova³**,
A.O. Amirgazin⁴, **K.K. Mukanov⁴**, **A.B. Shevtsov⁴**

¹«Eurasian National University named after L.N. Gumilyov», Kazakhstan, Nur-Sultan

²«D.V. Sokolsky Institute of Fuel, Catalysis and Electrochemistry» JSC, Kazakhstan, Almaty

³Non-profit limited company «A.Baitursynov kostanay regional university», Kazakhstan, Kostanay

⁴«National Center for Biotechnology», Kazakhstan, Nur-Sultan

*e-mail: kamalova@biocenter.kz

DEVELOPMENT OF A PROTOCOL FOR WHOLE GENOME SEQUENCING OF THE SARS-COV-2 VIRUS

Whole-genome sequencing of the SARS-CoV-2 virus during the pandemic has become an essential part of the epidemiological control of the spread of coronavirus infection. This made it possible to get actual data of circulating genetic variants and mutational changes of SARS-CoV-2 during the pandemic. The obtained results provided an opportunity for researchers to collect additional data to evaluate the virulence, infectivity, and the likelihood of evading an immune response when using vaccines and therapeutic monoclonal antibodies. There are different technological approaches for whole-genome sequencing of SARS-CoV-2, but multiplex PCR amplification is used most often due to ease of implementation and cost-effectiveness. When performing research on viral genome sequencing, researchers need to optimize existing sequencing protocols with available reagents or develop new approaches. This study is devoted to the development of a protocol for whole-genome sequencing of the SARS-CoV-2 virus based on the use of RT-PCR amplification using 39 primer pairs in 3 reaction mixtures. The protocol made it possible to obtain 15 complete genome data of the SARS-CoV-2 and can probably be used for large-scale studies on viral genome sequencing.

Key words: COVID-2019, SARS-CoV-2, RNA, whole genome sequencing.

Д.К. Камалова^{1,4*}, М.Ж. Жұрынов², Г.А. Тасанова³,
А.О. Амиргазин⁴, Қ.Қ. Мұқанов⁴, А.Б. Шевцов⁴

¹А.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

²«Д.В. Сокольский атындағы Жанармай, Катализ және Электрохимия Институты» АҚ, Қазақстан, Алматы қ.

³«А. Байтұрсынов атындағы Қостанай өңірлік университеті» КеАҚ, Қазақстан, Алматы қ.

⁴Ұлттық биотехнология орталығы, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

*e-mail: kamalova@biocenter.kz

SARS-COV-2 вирусының толықгеномды секвенерлеу хаттамасын әзірлеу

Пандемия кезеңінде SARS-CoV-2 вирусын толықгеномды секвенерлеу коронавирусы инфекциясының таралуын бақылаудағы эпидемиологияның ажырамас бөлігі болып қалыптасты. Бұл пандемия кезеңінде SARS-CoV-2 вирусының мутациялық өзгергіштігі мен айналымда жүрген генетикалық түрлері туралы жаңартылған деректер алуға мүмкіндік берді. Алынған нәтижелер зерттеушілерге екпелер мен терапевтік моноклоналды антиденелерді пайдалану кезінде вируленттілік, инфекциялық және иммундық жауаптан жалтару ықтималдығы туралы қосымша деректерді жинақтауға мүмкіндік берді. Қазіргі таңда SARS-CoV-2 вирусын толықгеномды секвенерлеудің әр түрлі технологиялық тәсілдері бар, бірақ мультиплексті ПТР амплификация өзінің жеңіл қолданылуы мен үнемшілдігі тұрғысынан жиі қолданылады. Вирустар геномын секвенерлеу алдында зерттеушілер секвенерлеу хаттамасын өздеріне қолжетімді реагенттерді қолдана отырып, оңтайландырып алуы қажет немесе жаңа тәсілдер әзірлеулері керек. Мақалада жүргізілген зерттеу жұмыстары, 3 реакциялық қоспада 39 жұп праймерді қолдану арқылы, КТ-ПТР амплификациясын қолдану негізінде SARS-CoV-2 вирусын толықгеномды секвенерлеу хаттамасын әзірлеуге бағытталған. Хаттама SARS-CoV-2 вирусының 15 толық геномдық мәліметін алуға мүмкіндік береді және кең ауқымды вирустық геномды секвенерлеуге арналған зерттеулерде пайдаланылуы мүмкін.

Түйін сөздер: COVID-2019, SARS-CoV-2, ПНК, толықгеномды секвенерлеу.

Д.К. Камалова*^{1,4}, М.Ж. Журинов², Г.А. Тасанова³,
А.О. Амиргазин⁴, К.К. Муканов⁴, А.Б. Шевцов⁴

¹Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан

²АО «Институт топлива, катализа и электрохимии им. Д.В. Сокольского, Казахстан, г. Алматы

³НАО «Костанайский региональный университет имени А. Байтурсынова», Казахстан, г. Костанай

⁴Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Нур-Султан

*e-mail:kamalova@biocenter.kz

Разработка протокола полногеномного секвенирования вируса SARS-CoV-2

Полногеномное секвенирование вируса SARS-CoV-2 за период пандемии стало неотъемлемой частью эпидемиологического контроля за распространением коронавирусной инфекции. Это позволило обеспечить получение актуальных данных о циркулирующих генетических вариантах и мутационных изменениях вируса SARS-CoV-2 в период пандемии. Полученные результаты предоставили возможность исследователям накопить дополнительные данные о вирулентности, инфекционности, о вероятности уклонения от иммунного ответа при использовании вакцин и терапевтических моноклональных антител. Существуют разные технологические подходы для полногеномного секвенирования SARS-CoV-2, но мультиплексная ПЦР амплификация используется наиболее часто из-за простоты выполнения и экономичности. При выполнении исследований по секвенированию геномов вирусов исследователям необходимо оптимизировать существующие протоколы секвенирования под доступную реагентную или разрабатывать новые подходы. Данные исследования посвящены разработке протокола полногеномного секвенирования вируса SARS-CoV-2 на основе использования ОТ-ПЦР амплификации с использованием 39 пар праймеров в 3 реакционных смесях. Протокол позволил получить данные 15 полных геномов вируса SARS-CoV-2 и может быть использован для крупномасштабных исследований по секвенированию геномов вирусов.

Ключевые слова: COVID-2019, SARS-CoV-2, PHK, полногеномное секвенирование.

Introduction

Mankind throughout its history has repeatedly faced various kinds of pandemics. One of the latest pandemics that has affected all of humanity is the COVID-2019 (Corona Virus Disease 2019) pandemic caused by the SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). SARS-CoV-2 belonging to the Coronaviridae family, genus Betacoronavirus [1], is a single-stranded positive-polarity RNA-genome virus.

The first information about unknown pneumonia was made public on 31st of the December in 2019 in Wuhan, China. On the 3rd of January, 44 patients were confirmed infected and the whole genome sequence of the SARS-CoV-2 (nCoV2019) virus was obtained. Due to the exponential growth in numbers of infected people, the Chinese government introduced unprecedented quarantine measures on the 23rd January, with the closure of cities and the isolation of people. The number of new COVID-19 cases has decreased after a two-month surge. By the end of March, China had 81,554 confirmed cases of COVID-19, of which 50,007 were in Wuhan [2]. Nevertheless, the infection quickly spread beyond China and as of April 4, 2020, a total of 1,051,635 people had a confirmed diagnosis of COVID-19 in 208 countries, in which more than 75,000 deaths

have been reported [3]. On March 11th, 2020, the World Health Organization (WHO) announced that COVID-19 should be characterized as a pandemic [4]. At great economic cost, many countries have taken unprecedented measures to restrict the spread of the virus, including quarantines, closing borders, imposing restrictions on crowds, and imposing nationwide lockdowns [5]. As of February 20, 2022, there have been over 422 million confirmed cases and over 5.8 million deaths worldwide [6].

The control and fight against any virus outbreaks directly depend on various activities, including effective diagnostic procedures. Knowledge of mutational changes in the pathogen genome is crucial for assessing the adaptive changes of the virus, which can accumulate and affect its diagnosis, transmissibility, and pathogenicity [7]. Sequencing plays an important role in controlling the efficiency of antiviral drugs and vaccines, identifying determinants of drug resistance and variants capable of evading vaccine-immunity, and detecting possible recombination.

Advances in genome sequencing technology have resulted in an exceptionally large number of SARS-CoV-2 genomes being sequenced during the COVID-19 pandemic [8]. Genome sequences have been made publicly available through several repositories, including a data exchange service

hosted by the Global Initiative to Share All Influenza Data (GISAID) (<https://www.gisaid.org/>) [9,10]. In addition to public genome repositories, open source platforms for real-time data visualization and genomic data analysis also work, including NextStrain (<https://nextstrain.org>) and CoV-GLUE (<http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk>).

Analysis of the genome-wide data from the first months made it possible to differentiate genetic lines and mutations that increase transmissibility which led to rapid spread to all continents. For example, the D614G mutation in the S protein of SARS-CoV-2 was critical for S1 cleavage, facilitating virus fusion with the host cell membrane [11,12]. The G614 mutant, which originated in Europe in February 2020, quickly leaked to other parts of the world and accounted for more than 74% of all published sequences by June 2020 [13].

The rapid accumulation of genomic data required the classification of the genotypes. Several attempts have been made to classify circulating SARS-CoV-2 strains into lineages or genotypes, with potential differences in transmissibility and disease severity. A study on 103 genomes of SARS-CoV-2 provided by Lu R. et al. showed the existence of two lineages, named L and S [14]. A comparative study of the 160 SARS-CoV-2 virus genomes from different countries identified three subtypes A, B and C, with differences in geographical spread and distribution [15]. However, such studies have been criticized for possible sampling bias and misinterpretation of the results [16,17,18,19]. Limited or incorrectly drawn sampling would skew the inferences, potentially hiding a part of circulation and resulting in inaccurate estimates of mutation rates [20]. The World Health Organization has decided to designate coronavirus mutations with letters of the Greek alphabet. The first four letters went to strains from Britain (Alpha), South Africa (Beta), Brazil (Gamma) and India (Delta), Botswana and the Republic of South Africa (Omicron). During the pandemic, multiple variants of the alpha-, beta-, gamma-, delta-, and omicron-SARS-CoV-2 viruses were identified.

During molecular epidemiology studies and implementing whole genome sequencing of pathogens researchers face the need to apply a suitable sequencing protocol which may need adjusting. Several approaches have been proposed for sequencing the SARS-CoV-2 virus. The metagenomics approach is obtaining cDNA and its total sequencing, its disadvantage is the need to obtain a large number of high-quality reads which is not always possible given low virus titers or admixing human RNA in samples [21]. Another

approach is random amplification with one primer for whole genome sequencing, it allows to identify mixed variants, however much like metagenomics, requires a deep sequencing [22]. Yet another approach is multiplex-PCR-based enrichment before whole genome sequencing on 2nd and 3rd generation NGS sequencers [23,24].

The virus genome enrichment protocol based on specific amplification is easy to conduct and it is less costly. However, specific PCR-related points, variety of instruments in different laboratories, and different reagents, all require the optimization of the published protocols. The aim of this work was to develop a protocol for SARS-CoV-2 sequencing by using the PCR-enrichment followed by sequencing on the MiSeq platform (Illumina).

Materials and Methods

Clinical Samples and RNA Isolation

We used 30 RNA samples obtained from patients diagnosed with COVID-19. The samples were collected from the four regions of Kazakhstan.

The work with clinical samples was carried out BSL-3 facilities at the local branch of the National Center for Biotechnology (NCB) in Almaty (Kazakhstan). RNA was isolated from the clinical samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. 52904, QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. RNA was transferred to the NCB central laboratory in Nur-Sultan, Kazakhstan.

Primer design

The selection of primers was carried out using a consensus sequence created from the alignment of 500 full-genome sequences of the SARS-CoV-2 virus. The primers targeted conservative regions in the genome, with distance between primer-binding sites 800-1200 bp. Planned PCR products overlapped by 100-200 bp. Software FastPCR and NCBI PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) were used to compute the specific primers. The primers were chemically synthesized at NCB.

Primers check

cDNA was obtained using the Reverta-L kit (Russia) in a total volume of 120 µl according to the manufacturer's instructions. With each matched primers-pair, a PCR reaction was performed, including: forward and reverse primers in a final concentration 300 nM, 1U. SynTaq DNA polymerase (Synthol, Russia), 0.2 mM of each dNTP, 1x PCR buffer (Sintol, Russia), 2.5 mM MgCl₂, 3% DMSO, and 3 µl cDNA. The PCR amplification program is: first denaturation at 95°C for 3 minutes; 35 cycles:

95°C – 25 seconds, 59°C – 40 seconds, 72°C – 90 seconds, final elongation 72°C – 10 minutes.

Amplification products

The analysis of the amplified DNA fragments was performed by electrophoresis in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide. 1×TAE buffer was used as electrophoresis buffer. The gels were documented using the GelDoc (Bio-Rad) and analysed in QuantityOne (Bio-Rad). PCR-products sizes were compared to DNA Ladder 10kb (Thermo Scientific, #SM1293, 100–10000 bp).

Multiplex PCR Enrichment in Two-Step RT-PCR

For reverse transcription, RNAscribe RT kit (Biolabmix, Russia) was used according to the manufacturer's instructions. After the reverse transcription, 6 µl of cDNA was used for PCR. The reaction mixture included 2 µl of primers, 2U SynTaq DNA polymerase (Sintol, Russia), 0.2 mM each dNTP, 1-x PCR buffer (Sintol, Russia), 2.5 mM MgCl₂, 3% DMSO. The PCR amplification program had denaturation at 95°C for 3 minutes; 42 cycles: 95°C – 25 seconds, 57°C – 40 seconds, 72°C – 3 minutes, final elongation 72°C – 10 minutes.

Multiplex PCR Enrichment in One-Step RT-PCR

One-step RT-PCR was performed using the BioMaster RT-PCR-Extra reagent kit (2×). The reaction mixture was made in a volume 25 µl including 1 µl of primer-mixture, 12.5 µl of 2× manufacturer-supplied mixture RT-PCR-Extra, 1 µl of BioMaster Extra-mix, 7 µl of RNA, and 2.5 µl of DMSO. The PCR amplification program included reverse transcription for 30 minutes at 50°C, denaturation at 93°C for 3 minutes; 42 cycles: 93°C – 15 seconds, 57°C – 40 seconds, 68°C – 2 minutes, and final elongation 68°C – 10 minutes.

Preparation of DNA libraries and high throughput whole genome sequencing

The preparation of DNA libraries from PCR fragments was performed using the Nextera DNA Flex Library Prep Kit (24 samples) (Cat. No. 20018704, Illumina, USA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on a MiSeq sequencer platform (Illumina, USA) using MiSeq Reagent Kit v3, 600 Cycles (Catalog #MS-102-3003).

Bioinformatics

Bioinformatics analysis was done on Ubuntu 19.04 LTS operating system. Raw data quality control was performed using FastQC v0.11.7 [25] and MultiQC v1.8 [26] programs. Raw data trimming was performed using the Seqtk v1.3-r106 program [27].

The BWA v0.7.17-r1188 program [28] was used to map the reads to the reference sequence imported by accession number NC_045512.2 from the

GenBank (NCBI) database. Variant identification and consensus sequencing were performed using FreeBayes [Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv preprint arXiv:1207.3907 [q-bio.GN] 2012] and BCFtools [Danecek, Petr, et al. "Twelve years of SAMtools and BCFtools." Gigascience 10.2 (2021): giab008.]

Results

For use in the PCR-enrichment, thirty-nine 39 pairs of primers were designed covering the entire virus genome (Table 1).

The use of all selected primers-pairs in a monoplex reaction resulted in expected fragments varying in length by 800-1200 bp. Figure 1 shows the electropherogram of 28 primer pairs.

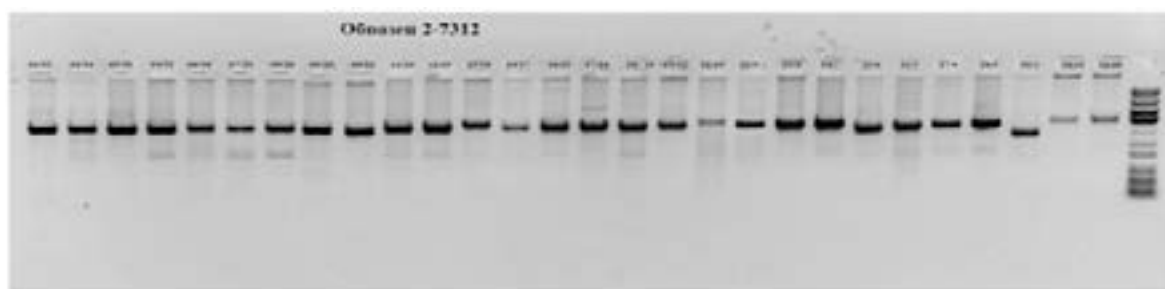
The selected primers were divided into 3 sets (Table 1). The primers were mixed in equal molarity to 4 pmol/µl of each primer. The resulting mixtures were used in one-step RT-PCR and for the 2nd step of the two-step PCR. For reverse transcription in two-step RT-PCR, a mixture of R primers was used, at 2 pmol/µl of each primer. The PCR products from amplifications with three primer-sets were mixed and purified with AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) in a 1:1 ratio. The quality of the obtained PCR products was checked by electrophoresis (Figure 2) and measuring concentration using the fluorimetric method.

No differences were found in the concentrations of PCR-products produced in multiplexed reactions on cDNA probes from different samples.

The results from whole-genome sequencing using the MiSeq platform (Illumina) included from 300 thousand to 600 thousand reads per sample, with average lengths from 172 bp up to 277 bp, and duplicated sequences totaling 71.9% to 81.5%. A large number of duplicated sequences can be explained by the sequencing of PCR products as a DNA template. The assembly of genomes by the mapping method resulted in complete genomes of 30 isolates of the SARS-CoV-2 virus. To evaluate coverage uniformity, we calculated the average coverage of each amplicon at a normalized depth of 500x reads per position. The whole genome sequencing protocol using one-step RT PCR resulted in a more uniform library (Figure 3A). However, two regions on the genome, i.e. the nt.8500-10000 and nt.22000-23000 regions have the coverage of less than 250x. The two-step RT PCR protocol had 8 to 12 genome regions with less than 250 coverage regions, as well as an unsequenced region (Figure 3B).

Table 1 – Primers for PCR amplification of the SARS-CoV-2 genome

Primers set 1		Primers set 2		Primers set 3	
F_4-29	aaaggtttatacctcccaggttaaca	F_590	gaaataccagtggtaccgca	F_1498	ctcttatgttggtgccataacaagt
F_2249	ggacaaattgtcacctgtgcaa	F_2996	tctggtgagtttaattggcttcac	F_3730	ttggtgctgacctatacattctt
F_4591	tgaactctgtgtacaatgccactt	F_5339	ccacctgctctacaagatgcttat	F_6091	ccagtttaactggtataagaacctgc
F_6839	gcatctatgccgactactatagcaa	F_7619	tgtgttaattgtgatacttctgtgct	F_8385	acaacattgctttgatatggaacgtta
F_9230	acacacgttatgtgctcatggat	F_9918	gtggagcaatggatacaactagc	F_10560	ggagttcatgctggcacagactta
F_11438	aatgctttagatcaagccatttcca	F_12221	gtggctaaatctgaattgaccgt	F_12991	acttggtagttagctgccaca
F_13757	tagacggtgacatggtaccaca	F_14630	cagtagctgcacttactaacaatgtt	F_15376	tgtagctgtcacacgctttctat
F_16172	acacttcaaggtattgggaacct	F_16915	ctgacatcacatacagtaatgccatta	F_17667	gggtgttatcacgcatgatgtt
F_18439	tccagagttagtgtcaaacacc	F_19196	attgcaatgtcgaatagatctctgc	F_19845	gggtgtggacattgctgcta
F_20752	gatagtgcacattacctaaggcat	F_22480	ccctgcatacactaattcttcacac	F_22898	ctccctcagggttttcgcytt
F_23108	gaactctacatgcaccagcaa	F_23853	accgtgctttaactggaatagct	F_24608	gcagaaatcagagcttctgctaa
F_25350	cagtgtctaaaggagtgcaattaca	F_26097	aattgtgatgagcctgaagaacat	F_26844	tccatgtgtgcatcatcagcaa
F_27612	cgtctatcagttacgtgccagat	F_28402	aggtttacccaataatctgcgtct	F_29860	gattgaaccagcttgagagcaa
R_886	agtgcataagctttaccagca	R_1733	tgcttataatccaaacctttcacagt	R_2376	tgcgtgacaaatgtttcacataat
R_3132	gcaccaaattccaaaggtttacett	R_3872	cttctcttttaggaatctcagcgat	R_4632	gagcagcttcttccaaatttaagc
R_5472	gcaagaatctaaattggcatgttgaa	R_6228	cattgttaacatgccaaacaataggtt	R_6980	ggttgagtagattaagaacctaggca
R_7715	aacgatgtaagaagactggtcagt	R_8530	accacccttaagtgtctattgtt	R_9650	aacataacatccactgaatagtgttaa
R_10300	gcatagaatgtccaaataacctgagtt	R_10792	cagaaagggtcctagtagtcaaca	R_11656	gtctaaagtacgggttgagtaacaa
R_12336	cattgtctgcatagcactagtaactt	R_13100	cccactagctagataatctttgtaagc	R_13962	acgttcacctaagttggcgat
R_14659	aattaccgggtttgacagtttgaaa	R_15521	ccgtgacagcttgacaaatgttaa	R_16285	atggtctacgtatgcaagcacc
R_17063	tggctccctggagtgtagaatact	R_17796	agtcccaaaatctttgagctaca	R_18575	gcccataagacaaatcagactctgt
R_20430	gccacattttctaaactctgaagctt	R_20072	gtttgggacctacagatggttgta	R_20874	ggtgcaactcctttatcagaacca
R_21640	cacgtgtgaaagaattagtgtatgca	R_22512	agattctgttggttgactctaaagt	R_23233	caaattgttggaaggcagaaacttt
R_24029	atctgcaagtgctactttgttgaa	R_24730	gcaagaagactacacatgaggt	R_25495	ggagtgaggcttgatcgggtat
R_26227	gagtacataagttcgactcatcagc	R_26983	atgtcacagcgtcctataggt	R_27838	cttgcaagttcaagtgaacacaaa
R_28496	tcatctggactgctattgtgtt	R_29327	tgctgcaatatgcttattcagcaa	R_30760	cctaagaagctattaaatcacatgg

**Figure 1** – Analysis of SARS-CoV-2 amplification results. The produced PCR products cover the entire SARS-CoV-2 genome (M), molecular weight marker (Thermo Scientific, #SM1293) (100-10000 bp, from 100-10000).

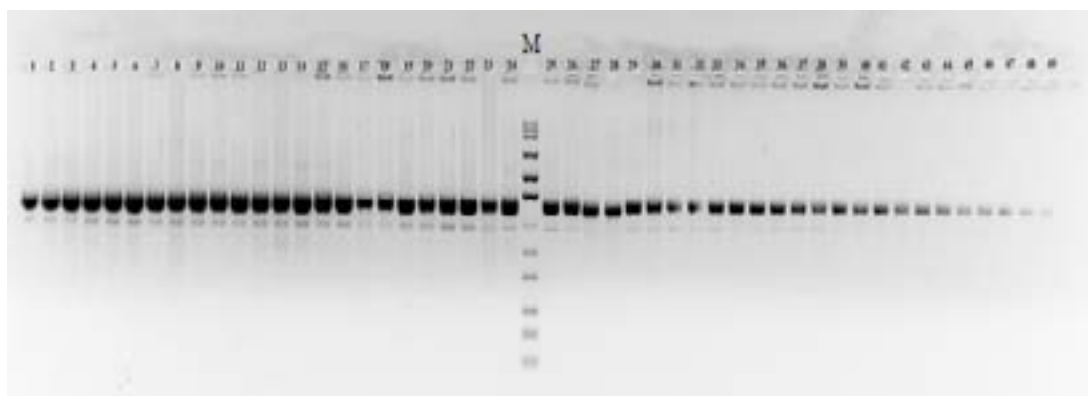


Figure 2 – Electrophoresis of pooled samples. These products were produced in multiplexed PCR with three primer-sets shown in Table 1. (M), molecular weight marker; 1-15 PCR products obtained in one-step RT-PCR; 16-30 PCR products obtained in one-step RT-PCR.

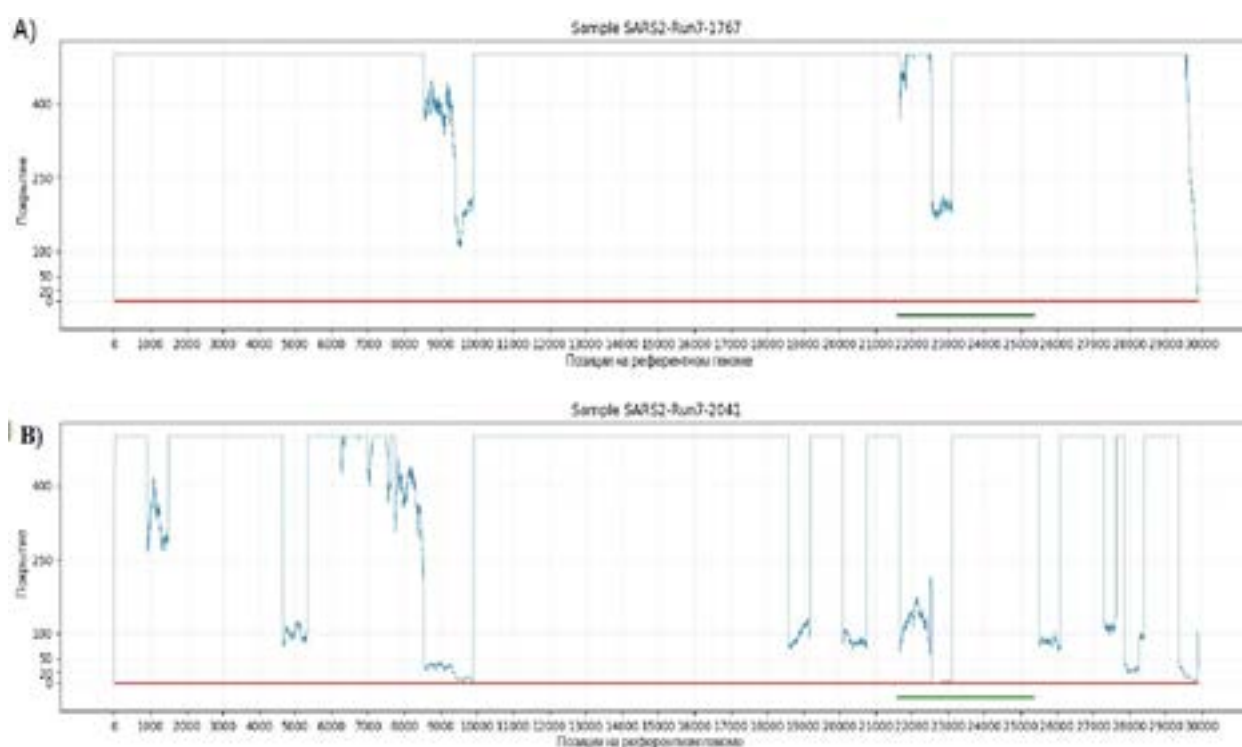


Figure 3 – Histogram of the average depth of amplicon sequencing. (A) using one-step RT PCR, (B) using two-step RT PCR

Discussion

The reduction in the costs of whole genome sequencing (WGS) facilitated the introduction of WGS into genetic epidemiology. In the majority of studies, the use of WGS data is retrospective. With such use, epidemiologists obtain the data on phylogenetic relationships, evolutionary changes,

drug resistance factors and virulence after the studied outbreak has been eliminated [29]. This approach does not apply to pandemics or outbreaks that pose a global threat or have the potential to develop into a pandemic. The first real-time genomic analysis of the behavior of the pathogen was applied during the outbreak of the Ebola virus in 2014-2015, by tracking changes in the structures

of circulating lineages and distribution pathways [30].

The COVID-19 pandemic mobilized the healthcare system of all countries and highlighted the need to introduce WGS into the pandemic control and monitoring system. In Kazakhstan, controlling genomic variability of the SARS-CoV-2 virus was introduced fairly soon. However, existing deficiencies in the infrastructure for genomic research of dangerous pathogens resulted in slowing down the research, because sequencing protocols needed to be optimized. Actually, the first sequencing-confirmation of SARS-CoV-2 in Kazakhstan and the first local data submitted to GISAID have been obtained by Sanger sequencing. Subsequent genomes were sequenced on MiSeq, but enrichment was required. The multiplex enrichment needs a high-titer virus sample which or a large amount of clinical sample, because each genome required 28 to 30 OT-PCR reactions. The use of prefabricated panels incurs high financial costs. In this work, we have developed a protocol for NGS sequencing of the SARS-CoV-2 virus with PCR enrichment in three reaction mixtures.

The WGS monitoring of the SARS-CoV-2 virus allowed describing multiple mutations and the discrimination of genetic lines, which when juxtaposed to epidemiological and functional data enabled predicting epidemic waves. The first functional missense mutation D614G in the gene encoding the spike protein (S-protein) was identified in March 2020 in Europe and the mutation rapidly propagated across the world. The D614G change was shown to enhance the virus replication in human lung epithelial cells and primary human respiratory tissues by increasing the infectivity and stability of virions, which explains the evolutionary

success of the mutant strains [31]. The emergence of the “delta” variant has raised concerns about the immune response evasion in vaccinated and recovering individuals [32].

Active mutational dynamics in SARS-CoV-2 highlights the importance of global genomic surveillance of the virus and could lead to early detecting of new emerging variants ahead of a possible epidemic wave. The whole genome sequencing method is currently being used to study the genetic diversity of the SARS-CoV-2 virus to supplement phylogenetic analysis, haplotype network analysis and genetic diversity studies [32].

Conclusion

Methods for complete-genome sequencing of SARS-CoV-2 were improved in this work. Protocols were optimized to include the PCR-enrichment with 39 designed primer-pairs. The enrichment of genomic sequences allowed using for WGS low-copy-virus samples or limited quantities of clinical samples. The results enable using 2nd and 3rd generation sequencing platforms for WGS with SARS-CoV-2 samples. This article presents the improved protocols and the utilization to conduct monitoring of SARS-CoV-2 genetic diversity in Kazakhstan.

Acknowledgment

This study was supported by the program BR10965271 “Development of highly effective medicinal substances from plant materials with antiviral activity against COVID-19 and similar viral infections” of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References

- 1 Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia JA, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study // *Lancet Resp Med.* – 2020. – Vol. 8. – P. 475–81. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
- 2 Li, Z., Guan, X., Mao, N., Luo, H., Qin, Y., He, N., & Gao, G. F. Antibody seroprevalence in the epicenter Wuhan, Hubei, and six selected provinces after containment of the first epidemic wave of COVID-19 in China // *The Lancet Regional Health-Western Pacific.* –2021. – Vol. 8. 100094.
- 3 of the International, C. S. G. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nat. Microbiol.* –2020. –Vol. 5. – P. 536-544.
- 4 Corman V. M., Muth D. Niemeyer D. Hosts and sources of endemic human coronaviruses // *Adv. Virus Res.* – 2018. – Vol. 100. – P. 163-188.
- 5 Annan A., Baldwin H.J., Corman V.M., Klose S.M., Owusu M., Nkrumah E.E., et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe // *Emerg. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 19. – P. 456-459.
- 6 <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-february-2022>
- 7 Taubenberger, J.K., Kash, J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation // *Cell Host Microbe.* – 2010, – Vol. 7. – P. 440–451.

- 8 World Health Organization. Summary table of SARS cases by country, 1 November 2002-7 August 2003. *Weekly Epidemiological Record // Relevé épidémiologique hebdomadaire*. -2003. – Vol. 78(35). – P. 310-311.
- 9 Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 367. – P. 1814-1820.
- 10 Reusken C.B., Haagmans B.L., Muller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., Meyer B., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study // *Lancet Infect. Dis.* – 2013. – Vol.13. –P. 859-866.
- 11 Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 Spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell* 182: 812–827. e819. pmid:32697968
- 12 Zhang L, Jackson CB, Mou H, Ojha A, Peng H, et al. (2020) SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity // *Nature communications*. – 2020. – Vol.11. – P. 1–9.
- 13 Yurkovetskiy L, Wang X, Pascal KE, Tomkins-Tinch C, Nyalile TP, et al. Structural and functional analysis of the D614G SARS-CoV-2 spike protein variant // *Cell* . -2020. – Vol.183. –p. 739–751.
- 14 Lu R., Zhao X., Li J., et al., Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – P. 565-574.
- 15 Wan Y., Shang J., Graham R., et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus // *J. Virol.* – 2020. – Vol. 94. doi: 10.1128/JVI.00127-20
- 16 de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. Family Coronaviridae. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses // Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London. – 2012. – P. 806-828.
- 17 Wan Y., Shang J., Graham R., et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus // *J. Virol.* – 2020. – Vol. 94(7). e00127-20.
- 18 Sun J., He W.T., Wang L., et al., COVID-19: epidemiology, evolution, and cross-disciplinary perspectives // *Trends. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 26. – P. 483-495.
- 19 Neurath M.F. Covid-19 and immunomodulation in IBD // *Gut*. – 2020. – Vol. 69. – P. 1335–1342.
- 20 Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *advances in virus research // Academic Press*. – 2006. – Vol. 66. – P. 193-292.
- 21 Manning, J. E., Bohl, J. A., Lay, S., Chea, S., Sovann, L., Sengdoeurn, Y., & Karlsson, E. A. Rapid metagenomic characterization of a case of imported COVID-19 in Cambodia // *Biorxiv*. -2020. doi: 10.1101/2020.03.02.968818
- 22 Chrzastek, K., Tennakoon, C., Bialy, D., Freimanis, G., Flannery, J., & Shelton, H. A random priming amplification method for whole genome sequencing of SARS-CoV-2 and H1N1 influenza A virus // *bioRxiv* – 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.25.449750>
- 23 Itokawa, K., Sekizuka, T., Hashino, M., Tanaka, R., & Kuroda, M. A proposal of alternative primers for the ARTIC Network's multiplex PCR to improve coverage of SARS-CoV-2 genome sequencing // *BioRxiv*. – 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.10.985150>
- 24 Resende, P. C. et. al. SARS-CoV-2 genomes recovered by long amplicon tiling multiplex approach using nanopore sequencing and applicable to other sequencing platforms // *BioRxiv*. – 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.069039>
- 25 Mukanov K. K., Shevtsov A. B. Berdimuratova K. T, Amirgazin A. O, Kuibagarov M. A, Lutsay V. B. Optimization of PCR purification using silica-coated magnetic beads // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. – 2020. – №. 1. – P. 81-89.
- 26 Andrews S. et al. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. – 2010.
- 27 Ewels P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report // *Bioinformatics*. – 2016. – T. 32. – №. 19. – C. 3047-3048.
- 28 Li H. Seqtk—Toolkit for Processing Sequences in FASTA/Q Formats; 2008.
- 29 Octavia, S., Ang, M. L., Van La, M., Zulaina, S., Saat, Z. A. A. S., Tien, W. S., Lin, R. T. Retrospective genome-wide comparisons of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from suspected outbreaks in Singapore // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2018. – P. 229-233.
- 30 Quick, J., Loman, N. J., Duraffour, S., Simpson, J. T., Severi, E., Cowley, L., Carroll, M. W. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance // *Nature*. – 2016. – Vol. 530(7589). – P. 228-232.
- 31 Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., Lokugamage, K. G., Shi, P. Y. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness // *Nature*. – 2021. – Vol. 592(7852). – P. 116-121.
- 32 Shastri, J., Parikh, S., Aggarwal, V., Agrawal, S., Chatterjee, N., Shah, R. & Pandey, R. Severe SARS-CoV-2 breakthrough reinfection with delta variant after recovery from breakthrough infection by alpha variant in a fully vaccinated health worker // *Frontiers in Medicine*. – 2021. – P. 1379.
- 33 Sekizuka T, Itokawa K, Kageyama T, Saito S, Takayama I, Asanuma H, Nao N, Tanaka R, Hashino M, Takahashi T, et al. Haplotype networks of SARS-CoV-2 infections in the Diamond Princess cruise ship outbreak // *Proc Natl Acad Sci USA*. -2020. – Vol. 117. – P. 20198–20201.

В.А. Кузовлев , Э.О. Абайлдаев* , А.А. Хакимжанов 

Институт молекулярной биологии и биохимии
им. М.А. Айтхожина КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: abaildayevaset@gmail.com

АКТИВНОСТЬ И КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ В ЗЕРНЕ И ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ, ЯЧМЕНЯ И ОВСА

Целью работы явилось сравнительное исследование уровня активности и состава β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов протеаз в зерне и проростках пшеницы, ячменя и овса. Эти белки выполняют важную физиологическую роль, а также участвуют в защите растений от патогенов. Эксперименты по проращиванию, выделению и анализу белков проводились в одинаковых условиях, что способствовало объективной оценке защитного потенциала у исследуемых злаков. Наибольшей активностью и степенью гетерогенности при ИЭФ β -1,3-глюканазы отличались зерна и проростки ячменя, тогда как для овса характерен относительно низкий уровень фермента. Высокую активность хитиназы имели зерна и проростки овса. Активность и изоферментный состав ПО сильно варьировал у трех злаков, как в покоящихся зернах, так и в органах проростка. Наибольшим содержанием ингибиторов протеаз обладали зерна пшеницы, а наименьшим – овса. Изученные свойства ферментов β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов сериновых протеаз субтилизина и трипсина в норме в качестве конститутивных могут быть полезными при изучении их изменчивости и индукции новых изоформ при стрессовых воздействиях, в том числе, вызванных патогенами. Эти данные могут быть использованы и для оценки некоторых качественных характеристик зерна.

Ключевые слова: пшеница, ячмень, овес, β -1,3-глюканаза, хитиназа, пероксидаза, ингибиторы протеаз.

V.A. Kuzovlev, A.O. Abaildayev*, A.A. Khakimzhanov

Institute of Molecular Biology and Biochemistry
named after M.A. Aitkhozhin SK MES, Kazakhstan, Almaty
*e-mail: abaildayevaset@gmail.com

Activity and component composition of defense proteins in grain and seedlings of wheat, barley and oats

The aim of the work was a comparative study of the activity level and composition of β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and protease inhibitors in grains and seedlings of wheat, barley and oats. These proteins play an important physiological role and are also involved in plant defense against pathogens. Experiments on germination, isolation, and analysis of proteins were carried out under the same conditions, which contributed to an objective assessment of the defense potential of the studied cereals. Barley grains and seedlings were characterized by the highest activity and degree of heterogeneity at IEF β -1,3-glucanase, while oats were characterized by a relatively low level of the enzyme. Oat grains and seedlings had high chitinase activity. The activity and isozymic composition of POX varied greatly among the three cereals, both in dormant grains and in the organs of the seedling. Wheat grains had the highest content of protease inhibitors, whereas oats had the lowest content. The studied properties of the enzymes β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase and serine protease inhibitors subtilisin and trypsin in norm as constitutive can be useful in studying their variability and induction of new isoforms under stressful conditions, including those induced by pathogens. These data can also be used to evaluate some quality characteristics of grain.

Key words: wheat, barley, oats, β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase, protease inhibitors.

В.А. Кузовлев, Ә.О. Абайлдаев*, А.А. Хакімжанов

ҚР БҒМ ҒК М.Ә. Айтқожин атындағы молекулалық биология
және биохимия институты, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: abaildayevaset@gmail.com

Бидай, арпа және сұлы дәндері мен өскіндеріндегі қорғаныш ақуыздарының белсенділігі мен компоненттік құрамы

Жұмыстың мақсаты бидай, арпа және сұлы дәндері мен өскіндеріндегі β -1,3-глюканазаның, хитиназаның, пероксидазаның және протеаза ингибиторлары белсенділігінің деңгейі мен құрамын салыстырмалы зерттеу болды. Бұл ақуыздар маңызды физиологиялық рөл атқарады, сондай-ақ өсімдіктерді қоздырғыштардан қорғауға қатысады. Өсіру, ақуыздарды оқшаулау және талдау бойынша тәжірибелер бірдей жағдайларда жүргізілді, бұл зерттелген дәнді дақылдардың қорғаныш әлеуетін объективті бағалауға ықпал етті. Арпа дәндері мен өскіндері β -1,3-глюканазаның ИЭФ бойынша ең жоғары белсенділік пен гетерогенділік дәрежесімен, ал сұлы ақуызының салыстырмалы түрде төмен деңгейімен сипатталды. Сұлы дәндері мен өскіндері хитиназаның жоғары белсенділігіне ие болды. Пероксидаза белсенділігі мен изоферменттік құрамы үш дәнді дақылда, қалыпты жатқан дәндерде де, өскіннің мүшелерінде де қатты өзгерді. Протеаз ингибиторларының ең көп мөлшері бидай дәндерінде, ал ең азы сұлыда болды. Конститутивтік қалыпты күйдегі ақуыздар β -1,3-глюканаза, хитиназа, пероксидаза және субтилизин мен трипсин сериндік ингибиторлардың зерттелген қасиеттері олардың өзгергіштігін, стресс жағдайында және қоздырғыштар тудыратын жаңа изоформалар индукцияланғанда пайдалы болуы мүмкін. Бұл деректерді астықтың кейбір сапалық сипаттамаларын бағалау үшін де пайдалануға болады.

Түйін сөздер: бидай, арпа, сұлы, β -1,3-глюканаза, хитиназа, пероксидаза, протеаза ингибиторлары.

Сокращения и обозначения

PR – связанные с патогенезом; ПО – пероксидаза; АФК – активные формы кислорода; БИ – белковый ингибитор; ДНС-3,5 – динитросалициловая кислота; ПАГ – полиакриламидный гель; ИЭФ – изоэлектро-фокусирование; pI – изоэлектрическая точка.

Введение

β -1,3-Глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторы протеаз выполняют разнообразные физиологические функции в растительном организме. В настоящее время их изучению уделяется пристальное внимание в связи с участием в защите растений против различных патогенов, они являются важными членами семейства PR (pathogenesis-related) белков. Помимо функциональных особенностей, различные формы и типы этих ферментов и ингибиторов отличаются по своим физико-химическим свойствам, регуляции активности и органной локализации.

β -1,3-Глюканаза (КФ 3.2.1.39) расщепляет внутренние β -1,3-связи в β -D-глюканах и принимает участие в таких физиологических процессах как прорастание семян и развитие проростков, старение органов, образование пыльцы, формирование каллозы при поранении и др. [1,2]. Дру-

гой важной функцией фермента является участие в защите растений от различных патогенов – вирусов, бактерий и грибов. Активность этого фермента значительно изменяется при патогенной атаке и может увеличиваться многократно [3]. Выявлена строгая компартментация двух основных форм β -1,3-глюканазы – внутриклеточная (в вакуолях и цитозоле) и внеклеточная, сосредоточенная в межклеточном пространстве (в апопласте). Для обеих форм показаны отличительные свойства и особенности функционирования в норме и при патогенезе [4]. β -1,3-Глюканазы подавляют рост болезнетворных грибов, так как их субстраты – β -полиглюканы являются одними из основных структурных компонентов клеточных стенок патогенов. Другой полисахарид грибных стенок хитин разрушается хитиназами (КФ 3.2.1.14). В ряде исследований показан синергизм в действии ферментов, усиливающий лизисный эффект [5,6]. Кроме того, в результате гидролиза образуются олигосахаридные элиситоры, запускающие ответные защитные реакции растения [7]. Оба фермента входят в состав PR-белков, при этом β -1,3-глюканазы образуют группу PR-2, а хитиназы – 4 группы из 17 (PR-3, -4, -8, -11) [8].

В составе растительных β -1,3-глюканаз насчитывается несколько (до 10) изоформ, имеющих широкий диапазон изоэлектрических точек

в кислой, щелочной и нейтральной области pH (от 3,5 до 10), а молекулярная масса варьирует от 30 до 40 кДа. На основе структурных различий β -1,3-глюканазы растений подразделяются на три основных класса (I, II, III), отличающихся по ферментной и антифунгальной активности [9]. Столь высокий полиморфизм фермента обусловлен в первую очередь сложной организацией естественных высокополимерных субстратов – β -глюканов и их разнообразных олигосахаридных производных [10].

В связи с важной защитной ролью, изучению хитиназ также уделяется большое внимание, о чем свидетельствует ряд обзоров [11,12]. У растений хитиназа, как и многие гидролазы полимеров, представлена множеством молекулярных форм и кодируется мультисемейством генов. Дополнительные трудности при исследовании возникают из-за наличия конститутивных и индуцибельных форм фермента, а также тканевой специфичности их экспрессии. Значительный полиморфизм хитиназы в первую очередь связан со сложной организацией природных субстратов – хитина и его производных олигосахаридов, что предполагает различия в структуре ферментов, их субстратной специфичности, кинетических характеристиках и других свойствах [13,14]. По типу действия на субстрат среди хитиназ выделяют эндохитиназы и экзохитиназы. Первые расщепляет хитин внутри полимера случайным образом с образованием растворимых низкомолекулярных мультимеров N-ацетилглюкозамина, таких как хитотриоза, хитотетраоза и димер диацетилхитобиозида. Вторые способны отщеплять только концевой углеводный остаток полимера [15].

Было показано, что нет определенной корреляции в распределении хитиназ по видам растений, их органам и тканям, но было установлено, что только некоторые из них обладают противогрибковыми свойствами [16, 17]. По первичной структуре хитиназы делятся на 7 классов (I-VII). Эта классификация основана на наличии или отсутствии N-концевого сигнального домена и сходстве последовательностей каталитического домена. Хитиназный комплекс наиболее изучен в табаке, а среди злаков – у ржи. Хитиназа злаков содержит около 10 изоформ с широким диапазоном изоэлектрических точек в кислых, основных и нейтральных pH от 3,1 до 9,7. Это предполагает различие в оптимуме действия pH, что очень важно для проявления активности при патогенной атаке [18,19].

Классические пероксидазы растений (КФ 1.11.1.7), относящиеся к классу III являются гемсодержащими гликопротеинами, их молекулярный вес лежит в пределах 28-60 кДа [20]. Эти ферменты секретируются за пределы клеток, или транспортируются в вакуоли, окисляют различные соединения от малых молекул до макромолекул. Основная физиологическая функция в растениях – нейтрализация АФК, образующихся при различного рода стрессах абиотического и биотического характера. ПО относятся к PR-белкам и составляют группу 9 [8]. У злаковых ПО представлена множественными молекулярными формами и может насчитывать у разных видов около 10 и более изоформ. Ферменты III класса являются самыми многочисленными и локализованы преимущественно в апопласте, клеточной стенке и вакуоли. ПО классифицируют по типу их взаимодействия с клеточной стенкой – свободно-растворимые, слабосвязанные и ионно- или ковалентно связанные [21]. ПО также делят по электрофоретической подвижности на анионные, нейтральные и катионные. Физиологические функции ПО многообразны и каждая из них связана со специфической изоформой фермента, однако очень трудно определить конкретную функцию отдельной изоформы *in vivo* [22]. Индуцированные патогеном или элиситорами ПО окисляют широкий спектр фенолпропаноидов, монолигнинов, приводящий к укреплению клеточных стенок и формированию лигнина [23,24].

В зерне злаковых содержатся разнообразные белковые ингибиторы экзогенных ферментов, в том числе фитопатогенных микроорганизмов. Эти белки относятся к компонентам защитной системы растений, поскольку они подавляют активность дигестивных ферментов и препятствуют росту патогена [25,26]. Одними из главных ферментов у грибов и бактерий являются протеазы, переводящие нерастворимый протеин в легкоусвояемые вещества [27]. Внеклеточные протеазы грибов в основном серинового типа и представлены субтилизин и трипсин подобными белками [28,29]. В зерне ячменя установлено наличие БИ сериновых протеаз, содержание которых у разных сортов существенно варьировало [30]. Для пшеницы и овса таких сведений не имеется. В настоящее время ингибиторы протеаз (группа 6 PR-белков) классифицированы в несколько семейств на основе их структуры и свойств. Эти белки с небольшим молекулярным весом от 6 до 24 кДа и в основном сосредоточены в зрелом зерне [31].

Все выше описанные ферменты и ингибиторы выполняют определенные функции у растений в обычных нормальных условиях. Другой их физиологической ролью является участие в защите растений от патогенов, они являются важными членами PR-белков. Все три фермента, а также ингибиторы протеаз имеют сложный состав и представлены множественными формами, что обусловлено разнообразием их функций. Это обстоятельство серьезно препятствует изучению их свойств и регуляции активности в норме и при стрессовых условиях. Несмотря на очевидный успех в этой области, основная масса работ направлена на исследование поведения этих белков в условиях различного рода стрессов и при патогенезе. Однако для точной идентификации конститутивных и индуцибельных форм ферментов и ингибиторов, их активности важным представляется изучение белков в норме. Кроме того, в литературе не имеется четких данных об активности, изоферментном составе и содержании данных PR-белков в сравнительном плане у важных трех злаков. Проростки и зерна (при хранении) наиболее уязвимы к поражению микробными фитопатогенами, в связи с этим, исследование их исходного защитного потенциала имеет несомненное научное и прикладное значение.

Целью работы явилось сравнительное изучение уровня активности и компонентного состава β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов протеаз в зерне и проростках важных зерновых культур – пшеницы, ячменя и овса в норме. В работе использован наиболее эффективный метод изучения изоферментного состава – изоэлектрофокусирование в сочетании с измерением общего уровня активности. Эксперименты по выделению и анализу белков проводились в одинаковых условиях, что дает возможность объективной сравнительной оценки количественного и качественного содержания защитных белков. Полученные данные могут быть полезными при изучении этих ферментов и ингибиторов, их функционирования при стрессах, в том числе патогенной атаки.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили зерна, корни и стебли проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Шортанды 98), ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Туран 2) и овса (*Avena sativa* L., сорт Кулагер).

2.1. Приготовление растительного материала и белкового экстракта

Для получения проростков зерна стерилизовали 5% перекисью водорода в течение 15 мин, промывали дистиллированной водой и проращивали в темноте при 24°C в течение 5 дней. Ферменты экстрагировали 1 ч при 4°C 0,05 М Na-ацетатным буфером pH 5,0 в соотношении растительный материал/буфер 1:3. Гомогенат центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин, супернатант использовали в качестве источника ферментов. Перед измерением активности β -1,3-глюканазы и хитиназы экстракты пропускали через колонку CentryPure («Serva», Германия) для удаления свободных сахаров. Для выделения ингибиторов протеаз 1 г покоящегося зерна размалывали в мельнице, добавляли 3 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,5. Смесь настаивали 2 ч на холоде и центрифугировали при 3000 g 15 мин. Супернатант переводили в 10 mM фосфатный буфер pH 7,0 на колонке CentryPure.

2.2. Определение активности β -1,3-глюканазы

Активность β -1,3-глюканазы определяли колориметрическим методом [32]. Для этого 0,8 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,2 и 0,1 мл образца фермента добавляли к 0,1 мл 0,5% ламинарина («Sigma-Aldrich», США), смесь инкубировали в течение 1 ч при 30°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мл ДНС, смесь кипятили 10 мин, охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли на спектрофотометре Ultrospec 7000 («GE Healthcare», Швеция) при 540 нм. Образовавшееся количество глюкозы определяли по калибровочной кривой. Активность фермента выражали в мг глюкозы в 1 мл⁻¹ за 1 ч⁻¹.

2.3. Определение активности хитиназы

Активность хитиназы определяли колориметрическим методом [32]. Для этого 0,8 мл 0,1 М Na-ацетатного буфера pH 5,2 и 0,1 мл образца фермента добавляли к 0,1 мл 5% коллоидного хитина («Sigma», США), смесь инкубировали 5 ч при 37°C при перемешивании. Реакцию останавливали 1 мл ДНС, смесь кипятили 10 мин, охлаждали и центрифугировали 10 мин при 3000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 540 нм. Образовавшееся количество N-ацетил-D-глюкозамина определяли по калибровочной кривой. Активность фермента выражали в мг N-ацетил-D-глюкозамина на 1 мл⁻¹ за 1 ч⁻¹.

2.4. Определение активности пероксидазы

Активность ПО определяли спектрофотометрическим методом с некоторой модификаци-

ей [33]. Реакционная смесь в кварцевой кювете на 2 мл содержала 10 мкл экстракта фермента, 1 мл 0,05 М ацетатного буфера pH 5,5, 0,5 мл 0,5% О-фенилендиамина («Sigma», США). Реакцию инициировали добавлением 0,5 мл 15 мМ H_2O_2 . Каждые 10 сек измеряли увеличение поглощения при 420 нм в течение двухминутного периода по сравнению с холостым образцом. Количество фермента, необходимое для образования 2,3-диаминофеназина, принимали за одну единицу активности и выражали как ед./мл⁻¹ в мин⁻¹.

2.5. Изоэлектрофокусирование

Нативный ИЭФ проводили в пластине 6% полиакриламидного геля (ПАГ) размером 90×120×1 мм с 1% Servalyt pH 3-10 («Serva», Германия) при 500 В в течение 5 ч в камере для электрофореза Multiphor II («GE Healthcare», Швеция).

2.5.1. Выявление β -1,3-глюканазы в геле

После ИЭФ пластину ПАГ помещали в 0,1 М раствор ацетатного буфера, pH 5,0, на 10 мин. Затем гель переносили в 1% раствор ламинарина в том же буфере на 30-40 мин (в зависимости от активности фермента) и инкубировали при 40°C. Гель дважды промывали дистиллированной водой, переносили в 7% уксусную кислоту на 10 мин и помещали в окрашивающий раствор 0,15% 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид («Sigma-Aldrich», США) в 1 М NaOH. Окрашивание проводили нагреванием в водяной бане до появления красноватых зон активности β -1,3-глюканазы (от 3 до 10 мин) [34]. В качестве маркеров pI использовали набор белков («Sigma-Aldrich», США): 9.3 – трипсиноген, 8.8, 8.6, 8.2 – лектин, 6.8, 7.2 – миоглобин, 6.6, 5.9 – карбоангидраза, 5.1 – β -лактоглобулин, 4.6 – ингибитор трипсина, 3.6 – амилоглюкозидаза.

2.5.2. Выявление хитиназы в геле

Активность хитиназы выявляли с помощью гелевой реплики с заподимеризованным субстратом 0,02% гликоль-хитина («Sigma», США) [35]. После ИЭФ разделяющий ПАГ и реплику помещали на 15 мин в 0,05 М ацетатный буфер, pH 5,0. Два геля плотно прижимали друг к другу и инкубировали в виде сэндвича 2 ч при 40°C. Затем гель-реплику переносили в 0,5 М трис-HCl буфер pH 8,9 с 0,01% флуоресцентным бриджтеном 28 («Sigma», США) и выдерживали 10 мин. Гель оставляли на ночь в воде при +4°C. Зоны активности визуализировали в УФ-свете (365 нм) с помощью гелъдока Quantum ST5 Gel Doc System («Vilber Lourmat», Франция).

2.5.3. Выявление пероксидазы в геле

После ИЭФ гель вымачивали 10 мин в 0,05 М ацетатном буфере pH 5,0, инкубировали 20 мин в буфере с 0,15% бензидином и 15 мМ H_2O_2 до появления синих полос, затем фиксировали в 7% уксусной кислоте [36].

2.6. Определение активности ингибиторов протеаз

Предварительно была подобрана концентрация бактериального субтилизина и бычьего трипсина («Sigma-Aldrich», США) для определения их активности – 2 мкг/мл. Реакционная смесь состояла из 0,1 мл фермента (из расчета 20 мкг/мл) + 0,1 мл (0,5 М фосфатного буфера pH 7,8) + 0,2 мл H_2O + 0,1 мл 20 мМ CaCl_2 + 0,1 мл экстракта (из расчета 0,2 или 0,5 мг белка/мл) + 0,5 мл 1% азоказеина («Sigma», США). Смесь инкубировали 1 ч при 30°C, после чего реакцию останавливали 1,0 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Образцы выдерживали на холоде 20 мин и центрифугировали 15 мин при 3000 g. Оптическую плотность фильтрата измеряли при 340 нм. За единицу активности принимали разницу оптической плотности ($\text{ОП}_{\text{контр}} - \text{ОП}_{\text{опыт}}$) в 1 мл за 1 ч (ед. активности г/мл ч.). Контролем служили значения активности субтилизина (9,40 ед. активности/мл ч) и трипсина (4,49 ед. активности/мл ч).

Эксперименты и измерения ферментной активности проводили в трех повторностях. Данные представлены в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений.

3. Результаты и их обсуждение

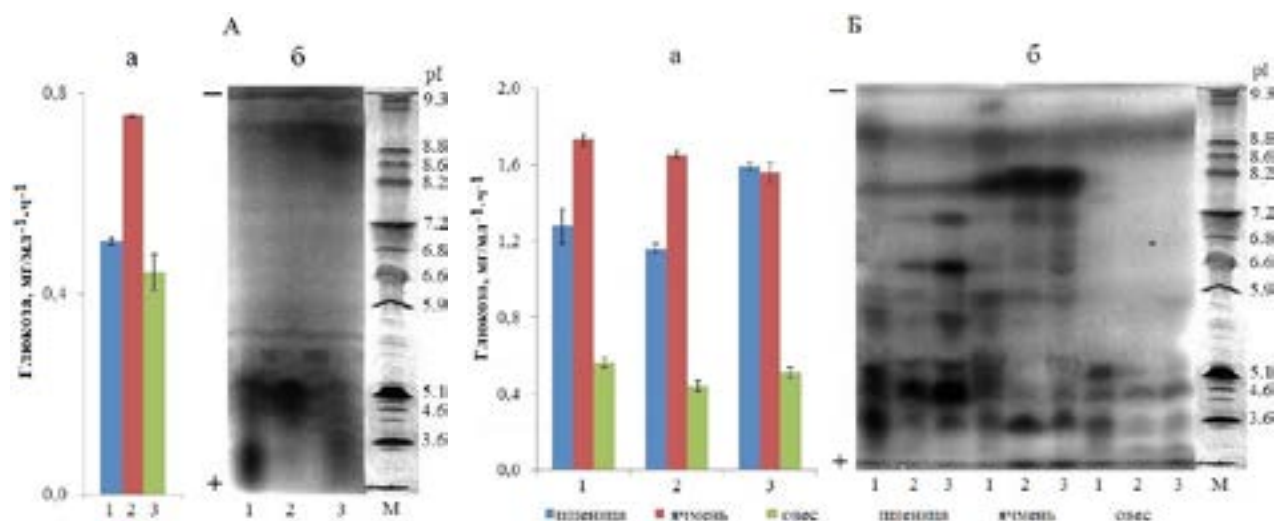
Активность и изоферментный состав β -1,3-глюканазы в зерне и проростках

Изучена активность β -1,3-глюканазы покоящегося зерна и различных органов 5-ти суток проростков пшеницы, ячменя и овса. Покоящиеся зерна пшеницы и овса содержали примерно одинаковые уровни активности фермента. В зерне ячменя активность фермента была немного выше (рисунок 1 – А, а). Значительное возрастание активности β -1,3-глюканазы наблюдалось при прорастании. Самой высокой активностью β -1,3-глюканазы характеризовались проростки ячменя, в особенности прорастающие зерна и ростки. Наименьшая активность фермента содержалась в проростках овса – почти втрое меньше по сравнению с ячменем. В проростках пшеницы максимальное содержание β -1,3-глюканазы приходилось на корни, приближаясь к активности фермента из ячменя. Не-

сколько меньшую активность β -1,3-глюканазы показали прорастающие зерна и ростки, тем не менее, их содержание в этих органах вдвое превышало фермент из проростков овса. Проростки овса обладали наименьшим количеством β -1,3-глюканазы и не отличались от активности фермента покоящегося зерна (рисунок 1 – Б, а).

При разделении β -1,3-глюканазы трех злаков методом ИЭФ наибольшая активность и гетерогенность состава была выявлена во всех органах проростка ячменя – в прорастающем зерне, ростке и корне. Относительный максимум фермента сосредоточен и в покоящемся зерне этого злака (рисунок 1 – А, б). В проростках овса значительная активность β -1,3-глюканазы также проявлялась в зерне, однако намного меньше по сравнению с ячменем. У пшеницы наибольшее число изоферментов β -1,3-глюканазы имели корни. Спектр ИЭФ β -1,3-глюканазы из различ-

ных органов злаковых включал несколько групп активности фермента в кислой, нейтральной и щелочной области рН с рI 3.2-5.4, 5.8-6.8, 8.0-9.3. Для всех видов злаков характерна активность этого фермента в кислой области рН 3.2-5.4 и в щелочной – 8.0-9.3. У овса полностью отсутствовали изоферменты β -1,3-глюканазы со слабокислыми и нейтральными рI (5.8-6.8), тогда как для проростков пшеницы (особенно в корнях), напротив, характерны высокая гетерогенность и активность фермента этой области рН (рисунок 1 – Б, б). Следует отметить – у всех злаков и во всех органах содержались изоформы с рI 3.2, 3.6, 4.6, 5.2. В щелочной области β -1,3-глюканаза была наиболее обильна в зерне ячменя и включала 3-4 изофермента с рI 8.0-8.2, 8.9 и 9.3. Особо надо выделить чрезвычайно высокую активность изоформ с рI 8.0-8.2 во всех органах проростка ячменя.



А – покоящееся зерно: 1 – пшеница, 2 – ячмень, 3 – овес. Б- проростки:

1 – прорастающее зерно, 2 – ростки, 3 – корни.

а – активность, б – ИЭФ фермента, м – маркеры рI.

Рисунок 1 – Активность и компонентный состав β -1,3-глюканазы в покоящемся зерне и органах проростка злаковых

Активность и изоферментный состав хитиназы в зерне и проростках

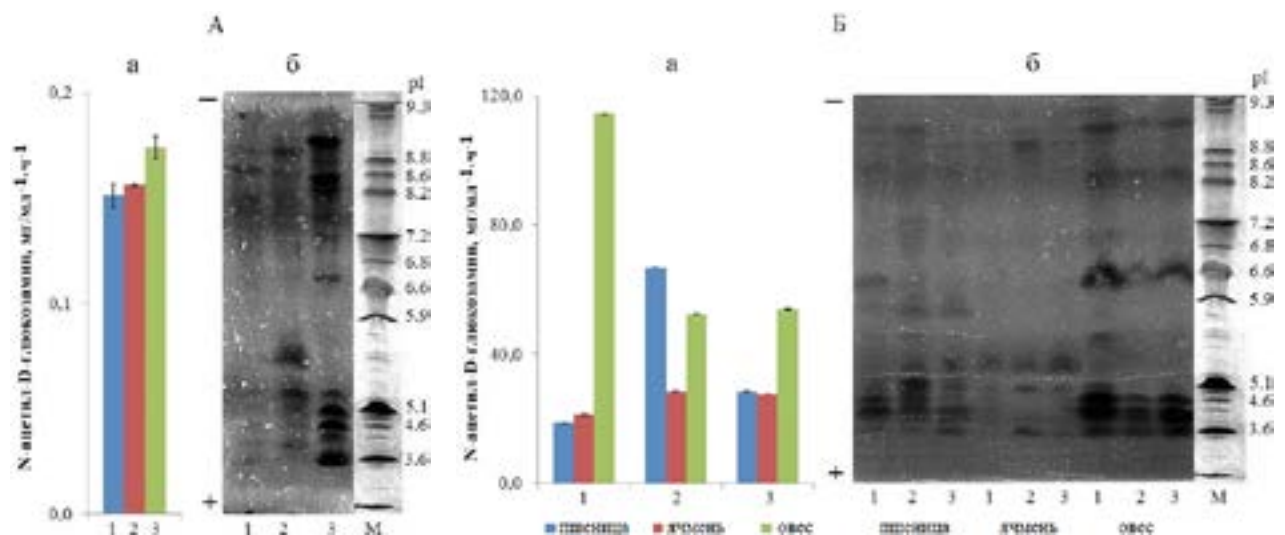
Изучение хитиназы показало существенные различия в активности фермента у покоящихся зерен между разными видами злаков. Чрезвычайно высокий уровень хитиназы наблюдался в зерне овса. Значительно меньше фермента содержали зерна пшеницы, а ячмень по этому показателю занимал промежуточное положение (рисунок 2 – А, а). При прораста-

нии активность хитиназы в зерне пшеницы и особенно овса увеличивалась, однако в ячмене уровень фермента заметно снижался. Очень высокой активностью хитиназы в целом обладали проростки овса, где фермент наиболее обилен в прорастающем зерне и был почти в 10 раз больше по сравнению с пшеницей и ячменем. В проростках пшеницы максимальным содержанием хитиназы отличались ростки, в которых активность фермента была 2-3 раза

выше, чем в корнях и прорастающем зерне. Сравнительно низкую активность хитиназы имели проростки ячменя с наименьшим содержанием фермента в прорастающем зерне (рисунок 2 – Б, а). Из представленных данных отчетливо виден значительный контраст между количеством фермента в покоящихся и прорастающих зернах у трех злаков.

ИЭФ хитиназ показало наибольшую гетерогенность фермента в покоящихся зернах, а также во всех частях проростков овса – в прорастающем зерне, ростках и корнях. Максимальная активность фермента присутствовала в зерне этого злака и она была намного больше по сравнению с пшеницей и ячменем (рисунок 2 – А, б). Однако в ростках пшеницы гетерогенность и активность хитиназы были тоже достаточно высоки. В составе хитиназы из различных органов злаковых были выявлены не-

сколько групп активности фермента, локализованных по всему ИЭФ спектру с pI 3.6-5.4, 5.8-6.8 и 8.0-9.3. Для всех видов и во всех органах обнаружены компоненты хитиназы с pI 3.6-4.5, а также с pI 5.2 (кроме овса). Следует отметить, что активность компонентов этого фермента в слабокислой и нейтральной области спектра (pI 5.8-6.8) была слабо выражена во всех органах проростков ячменя. В щелочной области pH выше 8.0 хитиназа была представлена несколькими компонентами, однако у пшеницы отсутствовали ферменты в районе pI 8.9-9.3. Чрезвычайно высокую активность имели кислые формы хитиназы у проростков овса, а также один нейтральный компонент в зерне с pI около 6.5 (рисунок 2 – Б, б). Наименее выраженными по активности и числу компонентов оказались хитиназы прорастающего зерна ячменя и пшеницы.



А – покоящееся зерно: 1 – пшеница, 2 – ячмень, 3 – овес. Б- проростки:

1 – прорастающее зерно, 2 – ростки, 3 – корни.

А – активность, б – ИЭФ фермента, м – маркеры pI.

Рисунок 2 – Активность и компонентный состав хитиназы в покоящемся зерне и органах проростка злаковых

Активность и изоферментный состав пероксидазы в зерне и проростках

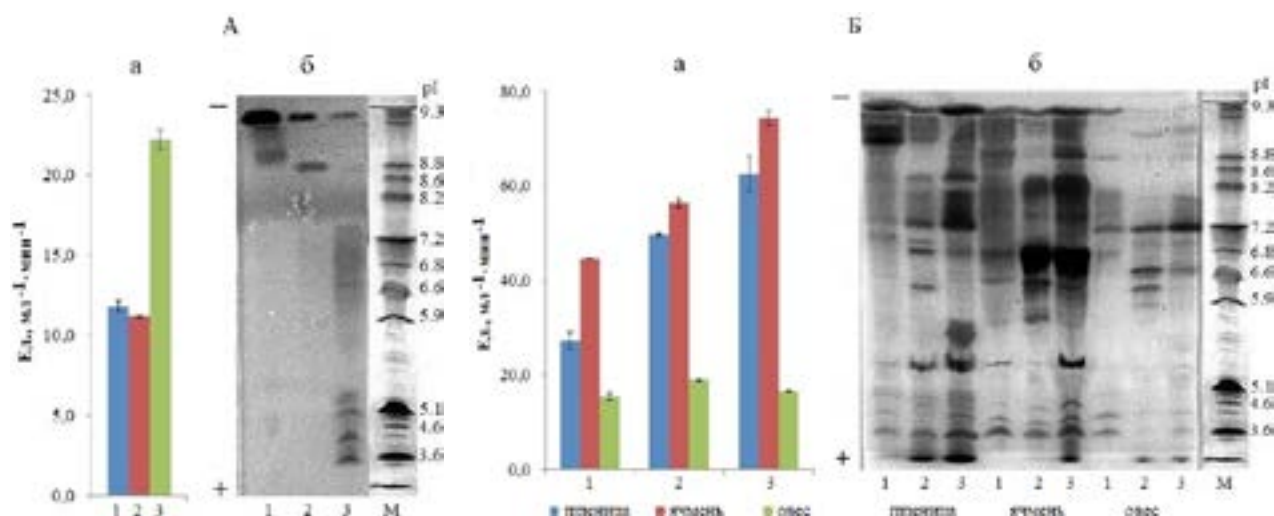
Изучение активности пероксидазы покоящихся зерен не выявило явных различий между тремя злаками. В зерне всех видов уровень фермента был низким. Однако при прорастании фермент претерпевал значительные изменения. Наибольшим содержанием ПО отличались проростки ячменя, где ферментом были особенно богаты корни и ростки. В пшеничных пророст-

ках максимум ПО, как и у ячменя, обнаруживался в корнях и заметно меньше в прорастающем зерне и ростках. Самым низким содержанием фермента характеризовались проростки овса, в особенности прорастающее зерно этого злака (рисунок 3 – А, а и Б, а)

ИЭФ пероксидаз показало низкую гетерогенность спектра фермента в покоящихся зернах пшеницы и ячменя – по 2 зоны активности в щелочной области спектра. В зерне овса до-

полнительно присутствовали 4 изофермента в кислом районе рН (рІ 3.6-5.4), а также слабо выявлялась группа изоферментов нейтральной области спектра (рисунок 3 – А, б). В проростках наибольшая активность фермента была обнаружена во всех органах – прорастающем зерне, ростке и корне у пшеницы и ячменя. В отличие от этих видов, спектр ПО проростков овса оказался намного беднее и в основном был представлен нейтральными формами в районе рН 5.9-7.0 (корни и ростки), а также двумя изоферментами в зерне с рІ 3.6 и 4.1. и слабо про-

являлась в кислой и щелочной области спектра. В проростках ячменя и пшеницы высокой активностью этого фермента отличались ростки и корни. Следует особо отметить присутствие в составе ПО ячменя двух сильно выраженных (мажорных) изоферментов с рІ 7.2 и 8.2 (корни, ростки) (рисунок 3 – Б, б). В отличие от щелочных и нейтральных, кислые изоформы у трех злаков имели большое сходство по своему составу и значениям рІ. В целом, изоферменты ПО распределялись в спектре ИЭФ в очень широком диапазоне рН от 3.0 до 9.3.



А – покоящееся зерно: 1 – пшеница, 2 – ячмень, 3 – овес. Б – проростки:

1 – прорастающее зерно, 2 – ростки, 3 – корни.

А – активность, б – ИЭФ фермента, м – маркеры рІ.

Рисунок 3 – Активность и компонентный состав пероксидазы в покоящемся зерне и органах проростка злаковых

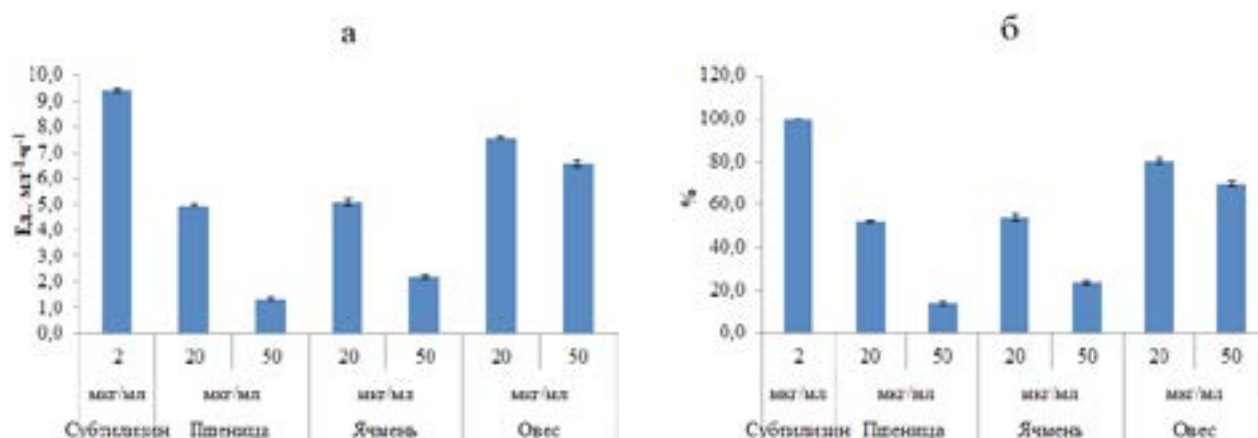
Активность ингибиторов протеаз в зерне

Изучение ингибиторов протеаз злаковых показало, что наибольшей антисубтилизиновой и антитрипсиновой активностью обладали зерна пшеницы, а наименьшей – овса. Зерновой экстракт пшеницы при концентрации 20 и 50 мкг/мл белка подавлял активность субтилизина на 47 и 86% и трипсина – на 48 и 84% соответственно. Намного меньшую антипротеазную активность имели зерна овса, экстракты из которых подавляли субтилизин лишь на 19 и 30%, а трипсин – на 30 и 66%. Ингибиторная активность зерна ячменя против субтилизина и трипсина при концентрации белка экстракта 20 мкг/мл очень близка по своим значениям к пшенице, однако при большей концентрации (50 мкг/мл) ее уровень был заметно ниже (рисунки 4 и 5).

Таким образом, в сравнительном плане изучены уровни активности и компонентные составы ферментов в зерне и проростках в норме у трех важных зерновых культур – пшеницы, ячменя и овса. Для этого все эксперименты по проращиванию, получению экстрактов и анализу ферментов производились в идентичных условиях. В результате были установлены существенные различия в активности и компонентном составе ферментов у трех видов злаков. Наибольшим содержанием β -1,3-глюканазы отличались зерна и проростки ячменя, высокой активностью и гетерогенностью характеризовались также корни 5-дневных проростков пшеницы. В сравнении с этими видами овес имел низкий уровень фермента. Обращает внимание факт наличия мажорных изофермен-

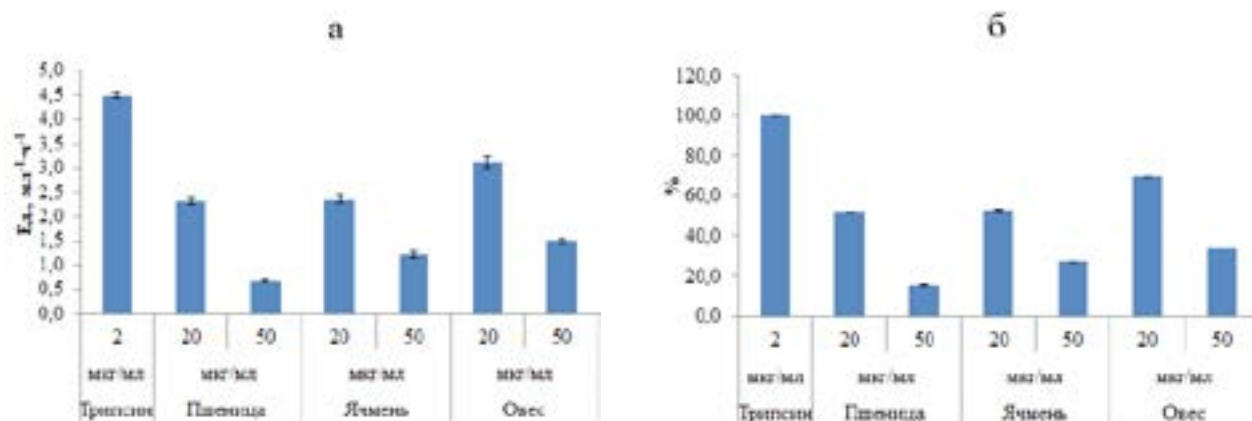
тов у ячменя как кислых, так и нейтральных и щелочных, напротив, у овса преобладали кислые изоформы. Злаковые культуры существенно отличаются по содержанию β -глюкана в зерне, его физико-химическим свойствам и растворимости. Так, например, у овса преобладает растворимый β -глюкан, тогда как у ячменя он в основном не растворимый [37]. Получен-

ные нами данные показали большие различия в активности и изоферментном составе β -1,3-глюканазы ячменя и овса. В связи с этим, можно предположить, что индивидуальные изоформы β -1,3-глюканазы могут выступать в качестве маркеров количественного и качественного содержания β -глюкана у различных видов и сортов зерновых культур.



а и б – активность фермента, выраженная в единицах и процентах.

Рисунок 4 – Влияние экстрактов зерна на активность субтилизина



а и б – активность фермента, выраженная в единицах и процентах.

Рисунок 5 – Влияние экстрактов зерна на активность трипсина

Отличительной особенностью хитиназы является отсутствие субстрата в растениях. В настоящее время имеются лишь косвенные сведения об участии данного фермента в физиологии самого растения. Основное назначение этого фермента, по-видимому, заключается в защите от хитин-содержащих фитопатогенов, в частности грибов. В нашем исследовании мы показали

уникальные свойства зерна и проростков овса, заключающиеся в очень высоком содержании хитиназы по сравнению с такими злаками, как пшеница и ячмень.

Активность и изоферментный состав пероксидазы также сильно варьировал у трех злаков, как в покоящихся зернах, так и в органах проростков. Фермент был значительно активнее в

проростках ячменя и пшеницы по сравнению с овсом. В ряде исследований была установлена роль анионной ПО в защитных функциях растений [38]. В нашей работе мы показали наличие этой изоформы в норме в корнях и ростках и отсутствие в зерне у всех трех злаков. Имеются также работы, где показано связь катионной (щелочной) ПО с базальной устойчивостью к грибному поражению [39]. По нашим данным эти изоформы хорошо выражены в зерне и корнях проростков пшеницы и ячменя, но не овса.

Несмотря на наличие существенных отличий в ИЭФ спектре ферментов из трех злаковых культур, все же можно проследить и ряд сходств. Например, многие компоненты хитиназы и пероксидазы кислой области спектра имели одинаковые значения pI . Похожие по локализации компоненты имеются и в щелочном диапазоне ИЭФ спектра. Наиболее значительные отличия между злаками имелись в составе β -1,3-глюканазы проростков, особенно в соотношении активности кислых и щелочных групп фермента. В этой связи представляет интерес исследование внутривидовых и сортовых особенностей изоферментов β -1,3-глюканазы и хитиназы. В этом направлении уже проведены работы на пшенице и тритикале, где были найдены коррелятивные связи между отдельными изоформами и плоидностью [40,41].

Анализ ингибиторов протеаз выявил наибольшую их активность в зерне пшеницы, а наименьшую – у овса. Зерновой экстракт пшеницы при концентрации 20 и 50 мкг/мл белка подавлял активность субтилизина на 47 и 86% и трипсина – на 48 и 84% соответственно. Заметно меньшую антипротеазную активность имели зерна овса, экстракты из которых подавляли субтилизин лишь на 19 и 30%, а трипсин – на 30 и 66%. Ингибиторная активность в зерне ячменя была близка по своим значениям к пшенице.

Заключение

В работе исследованы активность и компонентный состав β -1,3-глюканазы, хитиназы, пероксидазы и ингибиторов протеаз зерна и проростков пшеницы, ячменя и овса. Для разделения изоферментов был использован метод нативного изоэлектрофокусирования.

Сравнительный анализ показал, что, несмотря на близкое родство исследуемых злаков, в уровне активности и спектрах ИЭФ ферментов имелись значительные видовые особенности. Наибольшей активностью и степенью гетерогенности при ИЭФ β -1,3-глюканазы отличались

зерна и проростки ячменя, тогда как для овса характерен относительно низкий уровень фермента. Выявлены уникальные свойства зерна и проростков овса, заключающиеся в очень высоком содержании хитиназы по сравнению с пшеницей и ячменем. Активность и изоферментный состав ПО сильно варьировал у трех злаков, как в покоящихся зернах, так и в органах проростков. Обе, анионные и катионные формы были значительно активнее в зерне и проростках ячменя и пшеницы по сравнению с овсом. Установлен и ряд сходств в изоферментах у трех злаковых культур. Например, многие компоненты хитиназы и ПО кислой области спектра имели одинаковые значения pI . Похожие по локализации компоненты имелись и в щелочном диапазоне ИЭФ спектра.

Наибольшим содержанием ингибиторов протеаз обладали зерна пшеницы, а наименьшим – овса. Зерновой экстракт пшеницы при концентрации 20 и 50 мкг/мл белка подавлял активность субтилизина на 47 и 86% и трипсина – на 48 и 84% соответственно. Заметно меньшую антипротеазную активность имели зерна овса, экстракты из которых подавляли субтилизин на 19 и 30%, а трипсин – на 30 и 66%. Ингибиторная активность в зерне ячменя была близка по своим значениям к пшенице.

Изученные параметры ферментов и ингибиторов в норме в качестве конститутивных могут быть полезными при изучении их изменчивости и индукции новых изоформ при стрессовых воздействиях, в том числе, вызванных патогенами. Эти данные могут быть использованы и для оценки качественных характеристик зерна, например на содержание β -глюкана, а также применения зерновых культур и их экстрактов в сохранности пищевых продуктов и, в частности, от поражения микробными патогенами.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках бюджетной программы 217 «Развитие науки» и подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или научно-технической деятельности за счет средств республиканского бюджета», OR11465447, договор № 337 от 07 июля 2021 года.

Литература

- 1 Leubner-Metzger, Gerhard. "Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening." *Seed Science Research* 13, no. 1 (March 2003): 17–34.
- 2 Finnie, Christine, Kristian S. Bak-Jensen, Sabrina Laugesen, Peter Roepstorff, and Birte Svensson. "Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome." *Plant Science* 170, no. 4 (April 2006): 808–21.
- 3 Gupta, Poonam, Indu Ravi, and Vinay Sharma. "Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*." *Journal of Plant Interactions* 8, no. 2 (June 2013): 155–61.
- 4 Balasubramanian, Vaiyapuri, Divya Vashisht, Jean Cletus, and Natarajan Sakthivel. "Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi." *Biotechnology Letters* 34, no. 11 (August 1, 2012): 1983–90.
- 5 Gorjanović, Stanislava. "A review: biological and technological functions of barley seed pathogenesis-related proteins (PRs)." *Journal of the Institute of Brewing* 115, no. 4 (November 2009): 334–360.
- 6 Ali, Sajad, Bashir Ahmad Ganai, Azra N Kamili, Ajaz Ali Bhat, Zahoor Ahmad Mir, Javaid Akhter Bhat, Anshika Tyagi, Sheikh Tajamul Islam, Muntazir Mushtaq, Prashant Yadav, Sandhya Rawat, Anita Grover. "Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance." *Microbiological Research* 212–213, (July 2018): 29–37.
- 7 Mishra, Ajay Kumar, Kamal Sharma, and Raj Shekhar Misra. "Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants." *Journal of Plant Interactions* 7, no. 2 (June 2012): 95–120.
- 8 Loon, L.C. van, M. Rep, and C.M.J. Pieterse. "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants." *Annual Review of Phytopathology* 44, no. 1 (September 1, 2006): 135–62.
- 9 Sharma, Vinay. "Pathogenesis related defence functions of plant chitinases and β -1,3-glucanases." *Vegetos- An International Journal of Plant Research* 26, no. 2s (May 1, 2013): 205–218.
- 10 Jamar, Catherine, Patrick du Jardin and Marie-Laure Fauconnier. "Cell wall polysaccharides hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.): a review." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 15, no. 2 (June 30, 2011): 301–313.
- 11 Sharma, N., K.P. Sharma, R.K. Gaur, and V.K. Gupta. "Role of chitinase in plant defense." *Asian Journal of Biochemistry* 6, no. 1 (December 15, 2010): 29–37.
- 12 Kumar, Manish, Amandeep Brar, Monika Yadav, Aakash Chawade, V. Vivekanand, and Nidhi Pareek. "Chitinases—potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens." *Agriculture* 8, no. 7 (June 22, 2018): 1–12.
- 13 Kasprzewska, Anna. "Plant chitinases--regulation and function." *Cellular & molecular biology letters* 8, no.3 (January 1, 2003): 809–824.
- 14 Ohnuma, Takayuki, Tomoyuki Numata, Takuo Osawa, Hideko Inanaga, Yoko Okazaki, Shoko Shinya, Kaori Kondo, Tatsuya Fukuda, and Tamo Fukamizo. "Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a 'loopful' family GH19 chitinase from rye, *secale cereale*, seeds." *The FEBS Journal* 279, no. 19 (September 3, 2012): 3639–3651.
- 15 Stoykov, Yuriy Mihaylov, Atanas Ivanov Pavlov, and Albert Ivanov Krastanov. "Chitinase biotechnology: production, purification, and application." *Engineering in Life Sciences* 15, no. 1 (December 3, 2014): 30–38.
- 16 Taira, Toki. "Structures and antifungal activity of plant chitinases." *Journal of Applied Glycoscience* 57, no. 3 (February 23, 2010): 167–176.
- 17 Oyeleye, Ayokunmi and Yahaya M. Normi. "Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications." *Bioscience Reports* 38, no. 4 (August 29, 2018): 1–21.
- 18 Grover, Anita. "Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles." *Critical Reviews in Plant Sciences* 31, no. 1 (January 1, 2012): 57–73.
- 19 Tanaka, Jun, Tamo Fukamizo, and Takayuki Ohnuma. "Enzymatic properties of a GH19 chitinase isolated from rice lacking a major loop structure involved in chitin binding." *Glycobiology* 27, no. 5 (March 15, 2017): 477–485.
- 20 Hiraga, Susumu, Katsutomo Sasaki, Hiroyuki Ito, Yuko Ohashi, and Hirokazu Matsui. "A large family of class III plant peroxidases." *Plant and Cell Physiology* 42, no. 5 (May 15, 2001): 462–468.
- 21 Maksimov, I. V., E. A. Cherepanova, G. F. Burkhanova, A. V. Sorokan', and O. I. Kuzmina. "Structural-functional features of plant isoperoxidases." *Biochemistry (Moscow)* 76, no. 6 (June 17, 2011): 609–621.
- 22 Kukavica, Biljana M., Sonja D. Veljović-Jovanović, Ljiljana Menckhoff, and Sabine Lüthje. "Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth." *Journal of Experimental Botany* 63, no. 12 (July 1, 2012): 4631–4645.
- 23 Almagro, L., L. V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barceló, and M. A. Pedreño. "Class III peroxidases in plant defence reactions." *Journal of Experimental Botany* 60, no. 2 (December 10, 2008): 377–390.
- 24 Moural, Timothy W., Kevin M. Lewis, Carlo Barnaba, Fang Zhu, Nathan A Palmer, Gautam Sarath, Erin D. Scully, Jeffrey P. Jones, Scott E. Sattler, and ChulHee Kang. "Characterization of class III peroxidases from switchgrass." *Plant Physiology* 173, no. 1 (November 15, 2016): 417–433.
- 25 Mosolov, V. V., and T. A. Valueva. "Proteinase inhibitors and their function in plants: a review." *Applied Biochemistry and Microbiology* 41, no. 3 (May 1, 2005): 227–246.
- 26 Jashni, Mansoor Karimi, Rahim Mehrabi, Jérôme Collemare, Carl H. Mesarich, and Pierre J. G. M. de Wit. "The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant–pathogen interactions." *Frontiers in Plant Science* 6, no. 584 (August 3, 2015): 1–7.

- 27 Eggert, Kai, Hashdrai M. Rawel, and Elke Pawelzik. "In vitro degradation of wheat gluten fractions by *Fusarium graminearum* proteases." *European Food Research and Technology* 233, no. 4 (August 27, 2011): 697–705.
- 28 Valueva, Tatiana A., Natalia N. Kudryavtseva, Alexis V. Sof'in, Tatiana A. Revina, Ekaterina L. Gvozdeva, and Elena V. Ileva. "Comparative analyses of exoproteinases produced by three phytopathogenic microorganisms." *Journal of Pathogens* 2011, no. 947218 (December 14, 2011): 1–9.
- 29 Chandrasekaran, Murugesan, Boopathi Thangavelu, Se Chul Chun, and Muthukrishnan Sathiyabama. "Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity." *Journal of General Plant Pathology* 82, no. 5 (August 2, 2016): 233–239.
- 30 Pekkarinen, Anja I., Colin Longstaff, and Berne L. Jones. "Kinetics of the inhibition of *Fusarium* serine proteinases by barley (*Hordeum vulgare* L.) inhibitors." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, no. 7 (March 7, 2007): 2736–2742.
- 31 Clemente, Marina, Mariana Corigliano, Sebastián Pariani, Edwin Sánchez-López, Valeria Sander, and Víctor Ramos-Duarte. "Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming." *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 6 (March 17, 2019): 1–21.
- 32 Fink, Werner, Mathias Liefand, and Kurt Mendgen. "Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.)." *Plant Physiology* 88, no. 2 (October 1, 1988): 270–275.
- 33 Fornera, Sara, and Peter Walde. "Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine." *Analytical Biochemistry* 407, no. 2 (December 15, 2010): 293–295.
- 34 Pan, Shen-Quan, Xiang-Sheng Ye, and Joseph Kuć. "Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels." *Analytical Biochemistry* 182, no. 1 (October 1, 1989): 136–140.
- 35 Trudel, Jean, and Alain Asselin. "Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis." *Analytical Biochemistry* 178, no. 2 (May 1, 1989): 362–366.
- 36 Magro, Paolo. "Onion neck rot: isoperoxidase patterns in infected scales and the effect of *Botrytis allii* polygalacturonase on host peroxidase and phenolic compounds." *Rivista Di Patologia Vegetale* 20, no. 3 (September 1, 1984): 124–132.
- 37 Havrlentová, Michaela, Zuzana Petrušáková, Alena Burgárová, František Gago, Andrea Hlinková and Ernest Šturdík. "Cereal beta-glucans and their significance for the preparation of functional foods – a review." *Czech Journal of Food Sciences* 29, no. 3 (February 11, 2011): 1–14.
- 38 Maksimov, I. V., A. Sh. Valeev, E. A. Cherepanova, and G. F. Burkhanova. "Effect of chitoooligosaccharides with different degrees of acetylation on the activity of wheat pathogen-inducible anionic peroxidase." *Applied Biochemistry and Microbiology* 50, no. 1 (December 27, 2013): 82–87.
- 39 Takashima, Yuya, Miho Suzuki, Futoshi Ishiguri, Kazuya Iizuka, Nobuo Yoshizawa, and Shinso Yokota. "Cationic peroxidase related to basal resistance of *Betula platyphylla* var. *japonica* plantlet No. 8 against canker-rot fungus *Inonotus obliquus* strain IO-U11." *Plant Biotechnology* 30, no. 2 (June 25, 2013): 199–205.
- 40 Moravčíková, Jana, Denisa Margetinyová, Zdenka Gálová, Iwona Žur, Zuzana Gregorová, Mária Zimová, Eva Boszorádová, and Ildikó Matušíková. "Beta-1,3-glucanase activities in wheat and relative species." *Nova Biotechnologica et Chimica* 15, no. 2 (December 1, 2016): 122–132.
- 41 Moravčíková, Jana, Nikoleta Ujvariová, Iwona Žur, Zdenka Gálová, Zuzana Gregorová, Mária Zimová, Eva Boszorádová, and Ildikó Matušíková. "Chitinase activities in wheat and its relative species." *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)* 63, no. 1 (May 24, 2017): 14–22.

IRSTI 34.15.25

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v92.i3.010>

A.S. Nizkorodova^{1,2*} , E.R. Maltseva^{1,2} , D.A. Naizabayeva^{1,2} ,
Yu.A. Skiba^{1,2} , A.M. Alexandrova¹ , R.M. Nargilova¹ 

¹Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin, Kazakhstan, Almaty

²Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz

UNIVERSAL PRIMERS AND FLUORESCENT PROBE DETECT REFERENCE 18S RRNA GENE IN ALL VERTEBRATES

Detection of target genes via real-time PCR-based test-systems requires simultaneous detection of the internal control gene to avoid false negative results. Endogenous Internal Control genes (reference genes) have an advantage over the Exogenous Internal Controls (IC) as they are part of the cellular chromosomal DNA of an organism. Reference genes however have a disadvantage because they vary for each biological species causing additional development of primers and fluorescent probes for each separate biological species, which requires additional time and funds. In recent years, a significant number of studies are devoted to development of universal sets of primers / probes capable of detecting a reference gene in a wide range of biological objects – a whole class or even a living kingdom. Such universal sets of primers / probes will lead to unification of qPCR-based tests used in diagnostic purposes. This paper presents such a set for 18S rRNA reference gene determination in species included in the Vertebrata subtype. Using the developed set, the 18S rRNA gene was detected during the study in DNA samples of Mammals, Sauropsids, Amphibians, and Bony fishes; it showed 100% specificity. The set was also tested in different multiplex qPCR and kept specificity and sensitivity in tetraplex assay.

Key words: Real-time PCR, 18S rRNA, reference gene, vertebrates, internal control gene.

А.С. Низкородова^{1,2*}, Э.Р. Мальцева^{1,2}, Д.А. Найзабаева^{1,2},
Ю.А. Скиба^{1,2}, А.М. Александрова¹, Р.М. Наргилова¹

¹«М.Ә. Айтхожин атындағы молекулалық биология және
биохимия институты» ШЖҚ РМҚ, Қазақстан, Алматы қ.

²«Ұлттық биотехнология орталығы» ШЖҚ Алматы қаласындағы филиалы, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz

Универсалды праймерлер және флуоресцентті зонд барлық омыртқалыларда 18s рРНҚ генін анықтады

Нақты-уақыттағы-ПТР негізіндегі сынақ жүйелері арқылы мақсатты гендерді анықтау жалған теріс нәтижелерді болдырмау үшін ішкі бақылау генін бір мезгілде анықтауды талап етеді. Эндогендік ішкі бақылау гендерінің (референстік гендер) экзогендік ішкі бақылауларға (ІБ) қарағанда артықшылығы бар, өйткені олар ағзаның жасушалық хромосомалық ДНҚ бөлігі болып табылады. Референстік гендердің кемшілігі бар, өйткені олар әр биологиялық түр үшін өзгереді, бұл әрбір жеке биологиялық түр үшін праймерлер мен флуоресцентті зондтардың қосымша дамуын тудырады, бұл қосымша уақыт пен қаражатты қажет етеді. Соңғы жылдары көптеген зерттеулер биологиялық объектілердің кең ауқымында – тұтас класста немесе тіпті тірі патшалықта анықтамалық генді анықтауға қабілетті праймерлердің/зондтардың әмбебап жиынтықтарын әзірлеуге арналған. Праймерлердің/зондтардың мұндай әмбебап жинақтары диагностикалық мақсаттарда қолданылатын нақты-уақыттағы-ПТР негізіндегі сынақтарды біріктіруге әкеледі. Бұл құжат омыртқалылар қосақы түріне кіретін түрлердегі 18S рРНҚ анықтамалық генін анықтауға арналған осындай жинақты ұсынады. Әзірленген жиынтықты пайдалана отырып, 18S рРНҚ гені зерттеу барысында сүтқоректілердің, савропсидтердің, қосмекенділердің және сүйекті балықтардың ДНҚ үлгілерінде анықталды; ол 100% ерекшелігін көрсетті. Жиын сонымен қатар әртүрлі мультиплексті нақты-уақыттағы-ПТР-де сыналған және тетраплекстік талдауда ерекшелік пен сезімталдық сақталды.

Түйін сөздер: Нақты-уақыттағы-ПТР, 18S рРНҚ, референстік ген, омыртқалылар, ішкі бақылау гені.

А.С. Низкородова^{1,2*}, Э.Р. Мальцева^{1,2}, Д.А. Найзабаева^{1,2},
Ю.А. Скиба^{1,2}, А.М. Александрова¹, Р.М. Наргилова¹

¹РГП «Институт Молекулярной Биологии и Биохимии им. М.А. Айтхожина», Казахстан, г. Алматы

²Филиал РГП на ПХВ «Национальный Центр Биотехнологии», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz

Универсальные праймеры и флуоресцентный зонд, выявляют референтный ген 18S рРНК у всех позвоночных

Детекция генов-мишеней с помощью тест-систем на основе ПЦР-в-Реальном-Времени требует одновременного обнаружения гена внутреннего контроля, чтобы избежать ложноотрицательных результатов. Гены эндогенного внутреннего контроля (референсные гены) имеют преимущество перед экзогенным внутренним контролем (ВК), поскольку они являются частью клеточной хромосомной ДНК организма. Однако референсные гены имеют и недостаток, поскольку они различаются для каждого биологического вида, что приводит к дополнительной разработке праймеров и флуоресцентных зондов для каждого отдельного биологического вида, что требует времени и средств. В последние годы значительное количество исследований посвящено разработке универсальных наборов праймеров/зондов, способных обнаруживать референтный ген в широком круге биологических объектов – целого класса или даже живого царства. Такие универсальные наборы праймеров/зондов ведут к унификации тестов на основе ПЦР-в-Реальном-Времени, используемых в диагностических целях. В данной работе представлен такой набор для определения референсного гена 18S рРНК у видов, входящих в подтип Vertebrata. В ходе исследования с помощью разработанного набора в образцах ДНК млекопитающих, земноводных, амфибий и костных рыб ген 18S рРНК детектировался со 100%-ной специфичностью. Этот набор был также исследован в различных мультиплексных реакциях ПЦР-в-Реальном-Времени – специфичность и чувствительность набор сохранял вплоть до увеличения числа мишеней до четырёх в тесте (тетраплекс).

Ключевые слова: ПЦР-в-Реальном-Времени, 18S рРНК, референтный ген, позвоночные, ген внутреннего контроля.

Introduction

Currently, the vast majority of rapid diagnostic methods for determining viral and bacterial diseases are based on real-time PCR (qPCR). Diagnostic test systems that use real-time PCR for their functioning work with pico- and femtomolar amounts of matrices (both DNA and RNA), which often leads to false-negative results [1], especially in flow diagnostics laboratories.

False-negative results can occur in two cases: in the absence of the actual nucleic acid (NA) in the sample or because of the suppression (inhibition) of the PCR reaction [2]. The first option is possible both due to errors in the isolation of NA, and due to the low quality of the initial sample – there may be a temperature regime violation of the samples upon delivery to the laboratory, or an initially small amount of the original sample material. The second option is most often caused by the presence of inhibitors in the isolated NA, or by the failure of one of the components of the test system (possibly due to violations of its storage and use conditions).

In order to level up the listed reasons for the occurrence of false-negative results, the ability to detect an additional non-target gene is usually added to the test-systems. An additional gene is either

the Exogenous Internal Control (IC) gene, which is added to all samples when NA is isolated [3], or the Endogenous Internal Control gene (aka the reference gene), which is contained in the sample by default, since it is part of the genome of the studied organism.

The detection of IC cuts off only the second variant of the qPCR failure, since IC is artificially added to the samples it does not give an answer whether the samples actually contain the studied NA. At the same time, the detection of the reference gene allows not only stating the working status of the test-system, but also shows the presence of the desired NA in the sample. Despite such an advantage of the reference gene over the IC, it is IC that is used in most commercial test-systems, since IC is added to the sample during the experiment and works equally well for samples of any type and from any kind of organisms, including environmental samples [4].

The reference genes of eukaryotic organisms most frequently mentioned in the scientific literature are the following: *18S rRNA*, *28S rRNA*, *TUBA* (α -tubulin), *ACTB* (β -actin), *$\beta 2M$* ($\beta 2$ -microglobulin), *ALB* (albumin), *RPL32* (ribosomal protein L32), *TBP* (TATA-binding protein), *CYCC* (cyclophyllin C), *EF1A* (elongation factor 1 α), *GAPDH*

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *HPRT* (hypoxanthine phosphoribosyl transferase), *RPII* (RNA polymerase II) [5]. In each individual case of the target gene determination, its own reference gene is selected with a species-dependent sequence.

There are a number of commercial products designed to identify reference genes in various types of organisms. Thus, “Quiagen” produces a number of products under the general name “QuantiTect Primer Assay (200)”, designed to determine the endogenous reference gene in the sample – these products are produced separately for each species. At the same time, “Eurogentec” produces the product “18S rRNA Control kit FAM-TAMRA”, which is designed for real-time PCR detection of the human, rat, mouse, and rabbit 18S rRNA gene. In addition to this kit, “Eurogentec” produces a number of control kits that determine other reference genes, but in a smaller number of host species – “23S rRNA Control kit” (*E. coli*), “28S rRNA Control kit” (human and mouse) and ten more kits for human specimens only.

In research community is increasing the number of attempts to create universal sets for determining reference genes. In particular, a primer set was created for SYBR-based qPCR to determine the avian homologue of the hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene, which showed universality for a wide range of different birds’ species [6]. There are also data on the development of a set of primers and a fluorescent probe to determine the gene for core subunit 5 of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (*MT-ND5*) for all species of the Canine family [7]. The most universal set of primers and probe, which determines the 28S rRNA gene in all eukaryotic organisms, was successfully tested on 43 animal species belonging to insects, fish, mammals, and plants [8].

The reference gene for a universal set must meet certain requirements – it must not only be present in all organisms belonging to the target group, but also be present in their genomes in several copies. Such a multicopy cluster organization is characteristic of ribosomal RNA (rRNA) genes in absolutely all living cells [9]. One 45S rDNA cluster can contain several dozen copies of the 18S and 28S rRNA genes; Thus, the average number of copies of an individual ribosomal gene in homothermal animals is about 200 [10], while the average human genome contains from 200 to 600 copies [11].

A number of patents is known regarding the 18S rRNA gene as a reference gene. In particular, the

patent [12] specifies a number of reference genes for Chinese spruce, including the 18S rRNA gene. In the patent [13], the 18S rRNA gene is included in the combination of reference genes (along with 28S, GAPDH, HSP90, HSP70, RP49) to determine the stable expression of a number of proteins in the Asian ladybug. In the patent [14], the expression of the 18S rRNA gene (along with the IP-10 and CD3ε genes) is considered as a target for the detection of rejection states in renal transplantation. In the patent [15], the 18S rRNA gene is proposed as an endogenous internal control gene, which expression level is stable before and after hypoxic stimulation of ovarian cancer cells. But at the moment there is not a single study devoted to the development of a universal set of primers and a fluorescent probe for the detection of 18S rRNA.

The aim of the proposed work is to design primers and a TaqMan fluorescent probe that are universal for 18S rRNA gene sequence of all organisms belonging to the *Vertebrata* subtype, which will make it possible to use this universal set of primers / probe as an endogenous internal control for a wide range of diagnostic and research test-systems.

Materials and methods

Bacteria cultivation. *B. cereus* and *B. subtilis* strains were obtained as vegetative cells of cultivation controls “CultiControl” (“Liofilchem”, Italy). *E. coli* (DH-5α) and *A. tumefaciense* (EHA-101) strains were present in the laboratory. All bacteria were plated on sterile LB agar medium without antibiotics in a biosafety cabinet (class II). Plates were cultured at 37°C for 16 hours.

Isolation of total bacterial DNA. Isolation of DNA samples was carried out by the standard method of phenol-chloroform extraction according to [16]. The determination of the nucleic acids amount was carried out by measuring ultraviolet absorption on a “NanoDrope 2000” (“Thermo”) at a wavelength of 260 nm.

Samples for eukaryotic DNA isolation. Total DNA of eukaryotic organisms was isolated from blood samples of the following animal species: cow (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), chicken (*Gallus gallus*), duck (*Anas platyrhynchos*), camel (*Camelus dromedarius*), pig (*Sus scrofa*). DNA samples of the muscle tissue were isolated for: edible frog (*Pelophylax esculentus*), salmon (*Salmo salar*), pollock (*Theragra chalcogramma*). Animal blood samples were obtained in the framework of cooperation from the Almaty branch of

the “National Center for Biotechnology” (“NCB”). Muscle tissue samples were taken from commercial food samples purchased from supermarkets.

Total eukaryotic DNA isolation. DNA samples were isolated using the “M-sorb-OOM” (“Synthol”) isolation kit according to the manufacturer’s instructions. Muscle tissue samples were homogenized after freezing in liquid nitrogen by grinding in a mortar.

Primers and TaqMan fluorescent probe. The primers and the probe were synthesized in the organic synthesis laboratory of “NCB”. The primers and probe for 18S rRNA gene detection had the following sequence: CCGGACACGGACAGGATTG (forward primer), CGCTCCACCACTAAGAACG (reverse primer), ROX-ACGGCCATGCACCACCACC-BHQ2 (TaqMan probe).

Real-time PCR (qPCR). qPCR was carried out on “QuantStudio 5” and “QuantStudio 6 Pro” instruments (“Applied Biosciences”) in the following mode: 1) 95°C 7 min, 1 cycle; 2) 95°C 10 sec, 59°C 30 sec (data acquisition), 72°C 10 sec – 40 cycles. For real-time PCR, HotStart-Taq polymerase (“SibEnzyme”) was used with a standard HS-Taq buffer (“SibEnzyme”) additionally containing 0.15 mg BSA (“Thermo”), 0.5 mM dNTP (“SibEnzyme”), 2 mM MgCl₂ (“SibEnzyme”). Primers and TaqMan probe were added at 250 nM and 180 nM, respectively. From 10 pg to 10 ng of total DNA was used as a template in the reaction.

Results and discussion

Computer analysis of the 18S rRNA gene sequence

BLAST analysis of the reference 18S rRNA gene was carried out for the presence of minimal polymorphism among vertebrates (*Vertebrata*). For each of the classes of modern chordates, a separate BLAST analysis of a selected region of the 18S rRNA gene was performed (the original sequence belonged to the human 18S rRNA gene). The generalized results of the analysis of the selected region of the 18S rRNA gene in six classes of modern vertebrates are shown in Figure 1.

As can be seen from the results of the BLAST analysis, the selected sequence of 18S rRNA gene shows the greatest polymorphism in the *Cyclostomata* class, however, the primers were selected in such a

way that there was only one nucleotide substitution in the forward and reverse primer sequences (along with a non-homologous insertion in some species). The region of the 18S rRNA gene complementary to the fluorescent probe for all classes of vertebrates was the most conservative: there were no polymorphic variants in it. Also, polymorphisms were absent in the sequence complementary to the reverse primer (with the exception of *Cyclostomata* class). As for the forward primer, its sequence had a single nucleotide substitution (SNP – single-nucleotide polymorphism) in most representatives of the classes of cartilaginous and bony fish, amphibians, and reptiles.

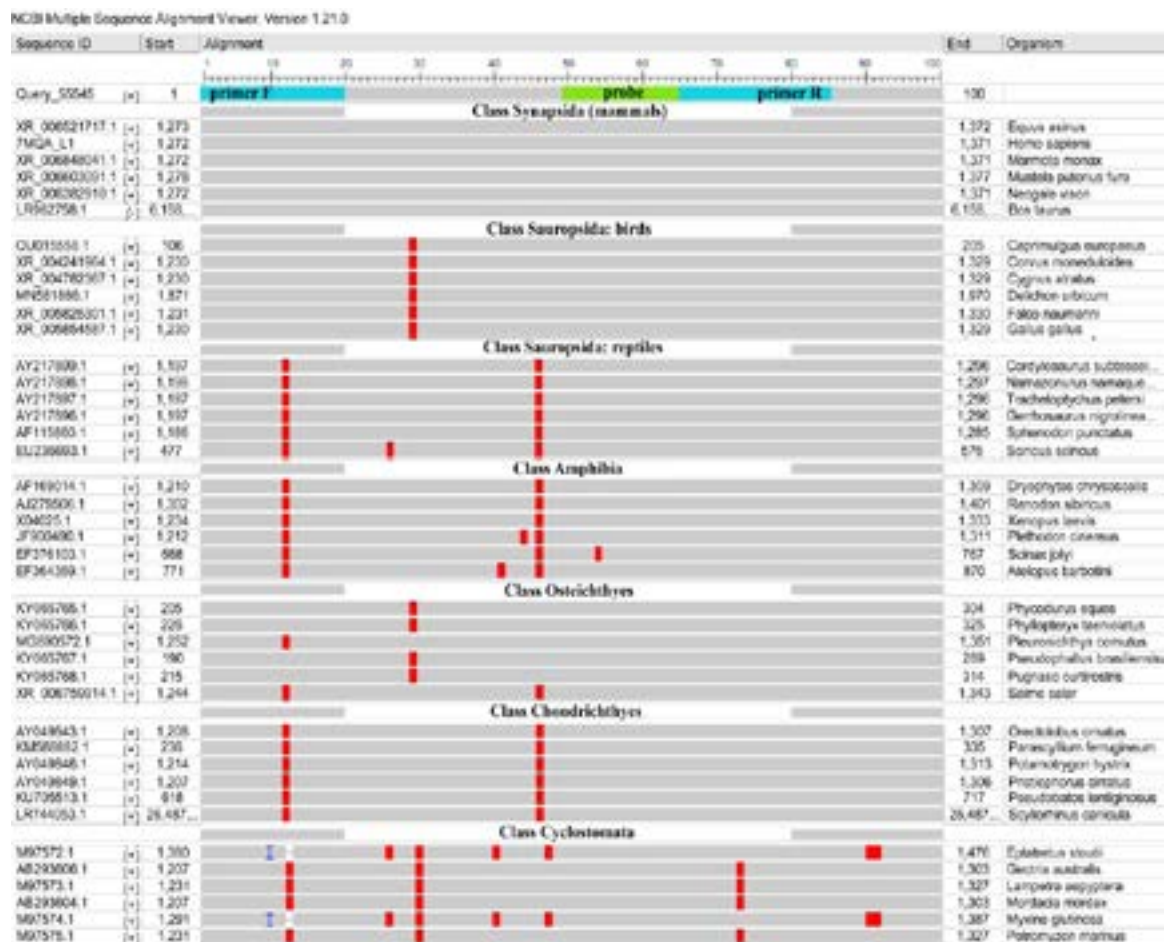
Thus, we determined the region of the 18S rRNA gene sequence with the minimum possible polymorphic variants: SNPs for the mammals and birds (as part of the class *Sauropsida* [17]) were absent; for the cartilaginous and bony fishes, amphibians and reptiles, one SNP was present in the forward primer; for the cyclostomes, one SNP was presented in the forward and reverse primers. BLAST analysis of the sequences of the selected primers and samples among prokaryotic organisms (separately for each class) showed a complete absence of homologous sequences.

All primer sequences were selected (“Vector NTI Suite 11.0”) so that the average annealing temperature (Therm.Tm) was from 59°C to 60°C, and for the TaqMan probe it was 61°C. In the “RNAstructure 5.0” program, an analysis of forming duplexes both between primers and between the probe and primers (singly) was made; the results of the analysis are shown in Figure 2. The maximum allowable duplex size was limited to 5 bp, with free energy not higher than -7 kJ.

Specificity and sensitivity determination

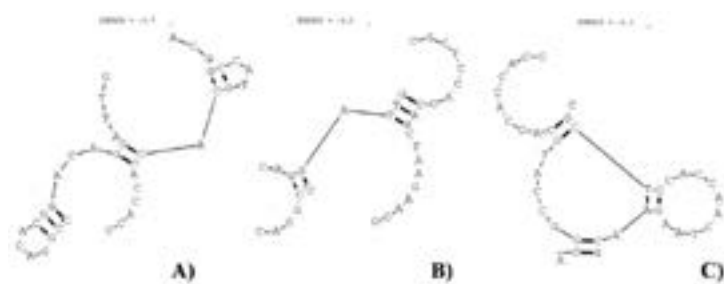
To analyze the specificity of the selected primers and probe, we used DNA samples isolated both from vertebrate animals (cow, sheep, goat, chicken, duck, camel, pig, edible frog, salmon, pollock) and from prokaryotic organisms (*E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *A. tumefaciense*). Graphical results of real-time PCR of all DNA samples from vertebrates (in one repetition) are shown in Figure 3.

Graphical data of real-time PCR for all replicates of prokaryotic DNA samples are presented in Figure 4. Generalized data (the number of repeats $n = 10$) for the specificity study of the set for the determination of 18S rRNA are presented in Table 1.



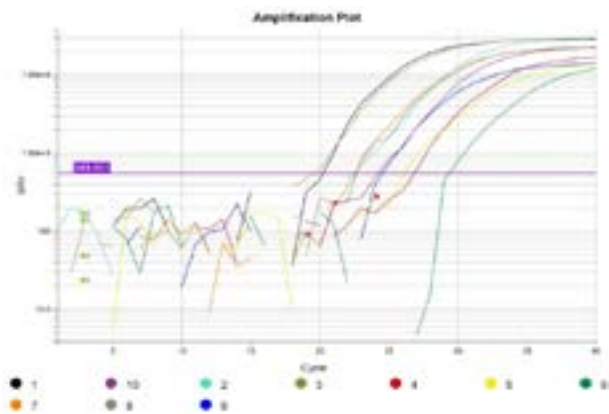
Note: several of the most characteristic representatives are shown for each class. In the upper part of the figure, on the target sequence of 18S rRNA are shown: forward primer (primer F), reverse primer (primer R), and fluorescent probe (probe).

Figure 1 – Results of BLAST analysis of the 18S rRNA gene region for some vertebrate species



Note: forward primer and probe (A), forward and reverse primers (B), reverse primer and probe (C).

Figure 2 – Double-stranded interactions between oligonucleotides designed for 18S rRNA gene detection



Note: Numbers indicate DNA samples of the following animals: 1 – cow, 2 – sheep, 3 – goat, 4 – chicken, 5 – duck, 6 – camel, 7 – pig, 8 – pollock, 9 – edible frog, 10 – salmon.

Figure 3 – qPCR results for the reference 18S rRNA gene on DNA samples from a number of vertebrates.

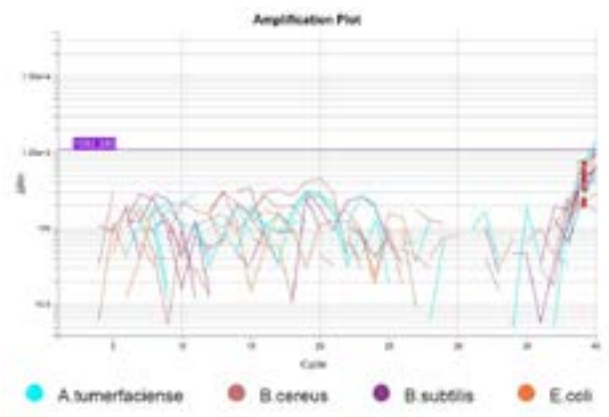


Figure 4 – RT-PCR results for the reference 18S rRNA gene on DNA samples from prokaryotes organisms

Table 1 – The results of qPCR specificity study for the primer and probe set

Species	Ct value, cycle number
cow	20.52 ± 2.28
sheep	26.72 ± 4.46
goat	22.15 ± 3.10
chicken	28.40 ± 2.95
duck	28.65 ± 3.01
camel	30.97 ± 1.33
pig	24.65 ± 1.25
pollock	24.08 ± 1.04
edible frog	25.89 ± 3.66
salmon	26.08 ± 2.64
<i>E. coli</i>	—
<i>B. cereus</i>	—
<i>B. subtilis</i>	—
<i>A. tumefaciense</i>	—

Thus, the specificity of the primers and probe set for the 18S rRNA gene detection in a number of vertebrates turned out to be absolute (the desired sequence was detected in 100% of the studied samples). Moreover, there were no problems with the determination of the 18S rRNA gene for the species from the classes of Bony fish (salmon, pollock) and Amphibians (edible frog), despite the fact that their sequence of the 18S rRNA gene complementary to the forward primer contains SNP (Figure 1). At the same time, in chromosomal DNA samples of both gram-positive (*B. cereus*, *B. subtilis*) and gram-negative (*E. coli*, *A. tumefaciense*) bacteria, the 18S rRNA gene was not detected in 100% of cases either.

To calculate the efficiency of the qPCR reaction and the sensitivity of the developed set of primers / probe, a series of dilutions of domestic pig genomic DNA (*Sus scrofa*) was used, a graphical representation of the results in the form of Ct is shown in Figure 5.

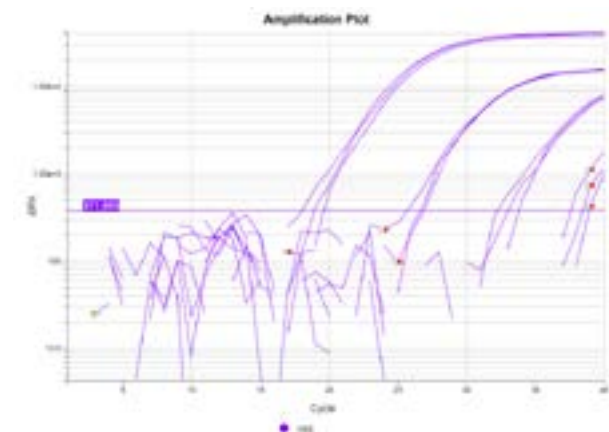


Figure 5 – qPCR results for the 18S rRNA reference gene on a series of dilutions of domestic pig DNA samples

According to [18, 19], the size of the domestic pig genome is about 2.7 Gbp, which made it possible to convert the dilutions of DNA samples into the number of whole genome copies and construct a standard curve shown in Figure 6.

Data analysis was performed in the Q-Gene program according to [20]. The sensitivity of the developed set of primers / probe determined by us was 10 fg of total pig chromosomal DNA. In terms of the genomes number [18], the sensitivity limit was 1.64 genomes. Thus, we have shown that the linear dynamic range (LDR), at which the approximation coefficient R^2 was equal to 0.99, had a length from 1.64 to 1642.5 genome copies per reaction [21]. The efficiency of the qPCR

reaction ranged from 87% to 113% (slope = -3.68) according to [22]. The exact number of copies of the 18S rRNA gene in the pig genome has not yet been established [23]; the number of 45S clusters

is known to be from 4 to 6 [24, 25], which, by analogy with the human genome, which has 10 clusters, limits the number of copies of the pig 18S rRNA gene within 300 per genome.

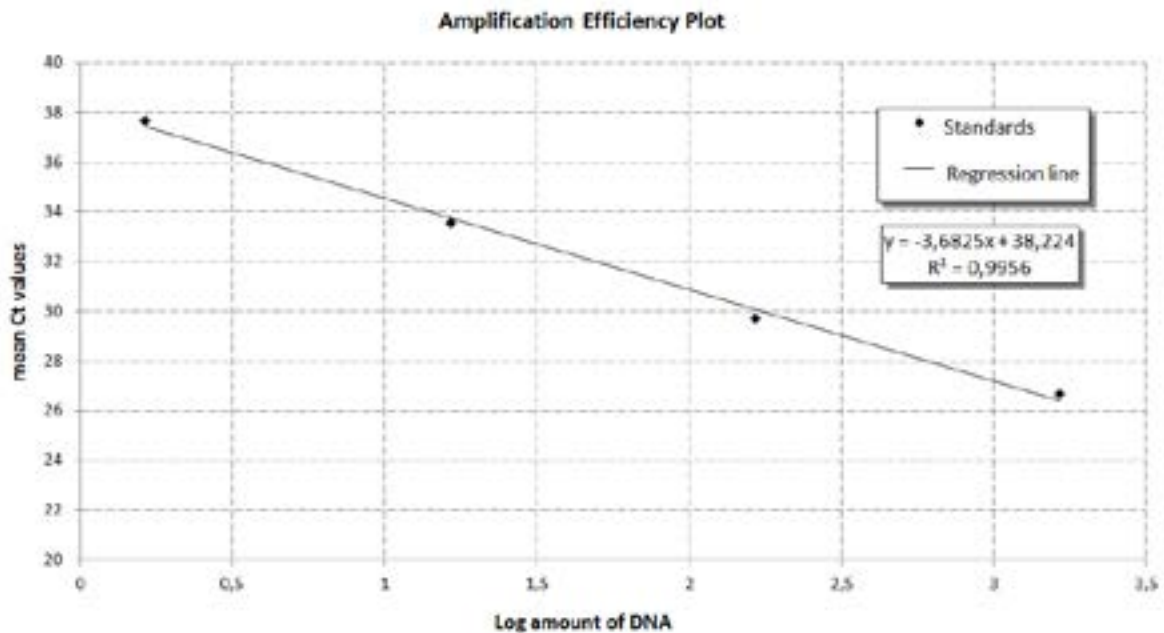


Figure 6 – qPCR data of the series of dilutions of domestic pig chromosomal DNA samples. Q-Gene program.

In order to determine the possibility of using primers and a probe for the 18S gene in a multiplex reaction, we carried out qPCR in parallel with the detection of several porcine genes most often used as reference: β -actin (TaqMan probe labeled with FAM), 23S ribosomal protein (TaqMan probe labeled with JOE), GAPDH (TaqMan probe labeled with Cy5).

The obtained results are presented in Table 2, where the first row shows the average threshold cycles for the singleplex reaction, from second to fourth rows show different variations of the duplexes, and the fifth row shows the tetraplex. There were no significant differences between the results for the 18S rRNA gene in different variations of qPCR.

Table 2 – Comparative analysis of qPCR performed in singleplex and multiplexes

qPCR variants	Average values of threshold cycles (n = 5) from fluorescence detection channel			
	ROX (18S)	FAM (β -actin)	JOE (RPS23S)	Cy5 (GAPDH)
1	22.13 $\pm$ 0.89	-	-	-
2	22.20 $\pm$ 0.91 (0.90)	35.04 $\pm$ 0.60	-	-
3	22.14 $\pm$ 1.05 (0.99)	-	36.46 $\pm$ 0.58	-
4	22.00 $\pm$ 1.10 (0.83)	-	-	36.99 $\pm$ 0.53
5	21.45 $\pm$ 1.35 (0.32)	34.25 $\pm$ 0.30	37.16 $\pm$ 0.33	36.96 $\pm$ 0.44

Note: In brackets is the actual t-test calculated in Microsoft Excel as a two-sample t-test with unequal variances and two-tailed distribution; the number of measurement repetitions was 10 or more (each of the multiplexes was compared with a singleplex). The significance level, indicating that the difference between the samples is significant, was taken as $p \leq 0.05$.

Since the use of multiplex real-time PCR may be associated with the selection of optimal conditions for the operation of all components of the multiplex, we studied the working range of 18S primers / probe depending on the concentration of Mg^{2+} (Figure 7). Previously, we established the optimal concentration of Mg^{2+} equal to 2 mM. The study was conducted on DNA samples

from domestic chicken; the minimum established working concentration of Mg^{2+} was 1.2 mM, the maximum was 3 mM. At a concentration of Mg^{2+} below 1.2 mM, the qPCR reaction did not occur; at a concentration above 3 mM, the specificity of the reaction decreased. Thus, to select the reaction conditions in the multiplex, it is possible to vary the concentration of Mg^{2+} within 1.8 mM.

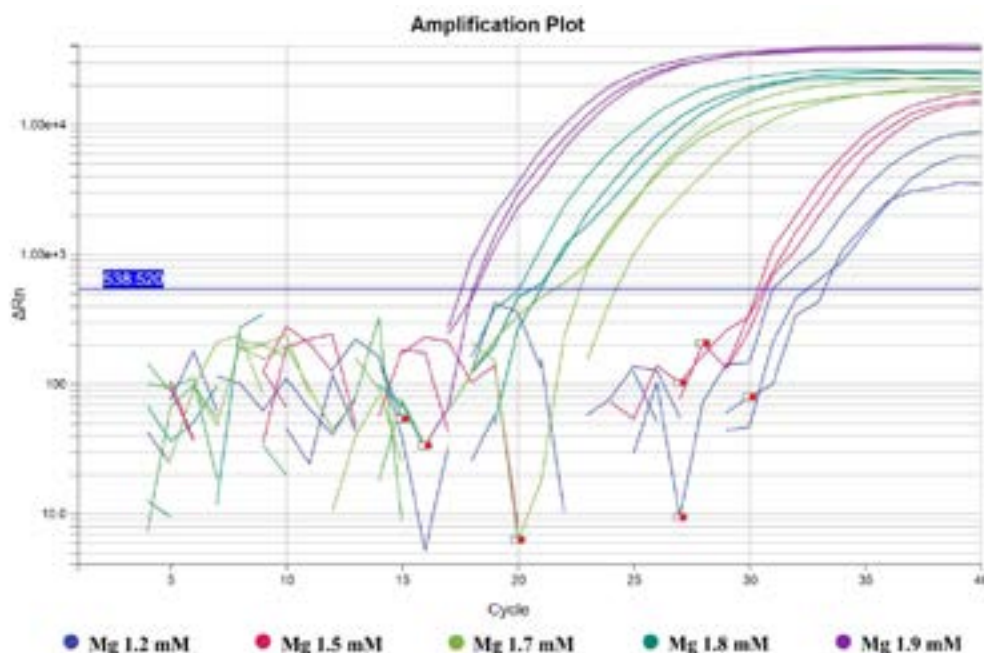


Figure 7 – qPCR results with varying Mg^{2+} concentrations on samples of chicken DNA.

Conclusion

The set of fluorescent probe, forward and reverse primers that we constructed showed 100% specificity for the eukaryotic 18S rRNA gene. DNA samples of cow, sheep, goat, chicken, duck, camel, pig, pollock, edible frog and salmon were examined – the reference gene was detected in all samples. At the same time, the 18S rRNA gene was not detected in the DNA samples of prokaryotic organisms, both gram-negative (*E. coli*, *A. tumefaciens*) and gram-positive (*B. cereus*, *B. subtilis*) bacteria. The versatility of the developed set for the detection of 18S rRNA in vertebrates from the classes of mammals, sauropsids (including birds), amphibians, and bony fishes was confirmed by the conducted qPCRs. The detection limit of the set, measured on the genome of the domestic pig, was 1.6 genomes (about 450 copies). The developed set can be used

in multiplex qPCR without reducing sensitivity to the reference 18S rRNA gene, the number of target genes could be increased up to four. We also showed the possibility for varying the reaction conditions of the qPCR by the concentration of Mg^{2+} within 1.8 mM (from 1.2 mM to 3.0 mM) without reducing the specificity of the set.

Conflict of interest

All authors have read and are familiar with the content of the article and have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was funded by the Ministry of Science and Education of Kazakhstan within the framework of the Government Program OR11465447-OT-21.

References

- 1 Ahmed W., Simpson S.L., Bertsch P.M., Bibby K., Bivins A., Blackall L.L., Bofill-Mas S., et al. (2022) Minimizing errors in RT-PCR detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA for wastewater surveillance. *Science of The Total Environment*, vol. 805, 149877. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149877>.
- 2 Pecoraro V., Negro A., Pirotti T., Trenti T. (2022) Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest*. vol. 52(2), e13706. doi:10.1111/eci.13706.
- 3 Wilson C.C., Wozney K.M., Smith C.M. (2016) Recognizing false positives: synthetic oligonucleotide controls for environmental DNA surveillance. *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 7, pp.23-29. doi: 10.1111/2041-210X.12452.
- 4 Dingle K.E., Crook D., Jeffry K. (2004) Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 42, pp. 1003-1011. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1003-1011.2004>
- 5 Kozera B., Rapacz M. (2013) Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.*, vol. 54(4), pp. 391-406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- 6 Wang Y., Zhang J., Patrick K. et al. (2020) Hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene-based endogenous internal control for avian species. *AMB Expr.*, vol. 10(181), <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01112-5>
- 7 Modarelli J.J., Ferro P.J., Esteve-Gasent M.D. (2018) Development and application of a canine endogenous internal positive control for use in real-time PCR assays. *J Vet Diagn Invest.*, vol. 30(5), pp. 789-792. <https://doi.org/10.1177/1040638718795206>
- 8 Mittelberger C., Obkircher L., Oberkofler V., et al. (2020) Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *Plant Methods*, vol. 16(53), <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00597-2>
- 9 Sochorová J., Garcia S., Gálvez F., Symonová R., Kovařík A. (2018) Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma*, vol. 127, pp. 141-150. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0651-8>
- 10 Long E.O., Dawid I.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem.*, vol. 49, pp. 727-764. doi:10.1146/annurev.bi.49.070180.003455.
- 11 Smirnov E., Chmúrčáková N., Liška F., Bažantová P., Cmarko D. (2021). Variability of Human rDNA. *Cells*, vol. 10(2), pp. 196. <https://doi.org/10.3390/cells10020196>
- 12 Ming L., Ying Zh., Xia H., Pengfei W., Peng S., Xianhua Z., Xiangqing M. (2020) Screening method of fir reference gene in different tissues and application of screening gene as reference gene. Patent CN108085409B (Application CN201711463831.2A, 2017-12-28).
- 13 Huipeng P., Chunxiao Y., Baoli Q., Jianhui W., Wen S., Xingmin W., Fengliang J. (2017) The reference gene combination and its application of *Harmonia axyridia* stable expression under the different factors. Patent CN107858438A (Application CN201710949106.XA, 2017-10-12).
- 14 Suthanthiran M., Ding R., Schwartz J.E., Shaked A. (2017) Methods to detect, treat and prevent acute cellular rejection in kidney allografts. Patent US9758828B2 (Application US14/170, 2013-01-31).
- 15 Wen Y., Tangbiao M., Rong L., Hongmei H., Jie Sh. (2020) Application of 18S RNA in qRT-PCR detection of gene expression before and after ovarian cancer cell hypoxia stimulation. Patent CN110951879B (Application CN201911347514.3A, 2019-12-24).
- 16 McKiernan H.E., Danielson P.B. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. 3d ed. NY: Academic Press; 2017. Chapter 21, Molecular Diagnostics; p. 371-394. doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3.
- 17 Mueller T., Wullimann M.F. (2016) Comparison of Vertebrate model systems: model systems, in: Mueller T., Wullimann M.F. (Eds.), Atlas of early Zebrafish brain development (Second Edition), Elsevier, pp. 205-226. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418669-9.00004-0>.
- 18 Humphray S.J., Scott C.E., Clark R., Marron B., Bender C., Camm N., Davis J., et al. (2007) A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biol.*, vol. 8, R139. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-7-r139>
- 19 Warr A., Affara N., Aken B., Beiki H., Bickhart D.M., Billis K., Chow W., et al. (2020) An improved pig reference genome sequence to enable pig genetics and genomics research. *Gigascience*, vol. 9(6), g1aa051. <https://doi.org/10.1093/gigascience/g1aa051>.
- 20 Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, vol. 32(6), pp. 1372-1378. PMID: 12074169.
- 21 Rebrikov D.V. and Trofimov D.Yu. (2006) Real-Time PCR: A review of approaches to data analysis. *Prikl Biokhim Mikrobiol.*, vol. 42(5), pp. 455-463. PMID: 17066950. (in Russian).
- 22 Kralik P., Ricchi M.A (2017) A basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.*, vol. 8, pp. 108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.
- 23 Rothschild M.F., Ruvinsky A. (2010) The Genetics of the Pig, 2nd Edition. UK: CABI, 496 p. ISBN-13: 978-1-84593-756-0.
- 24 Sochorová J., Gálvez F., Matyášek R., Garcia S., Kovařík A. (2021) Analyses of the Updated “Animal rDNA Loci Database” with an Emphasis on Its New Features. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22(21), pp. 11403. <https://doi.org/10.3390/ijms222111403>.
- 25 Mellink C.H.M., Bosma A.A., de Haan N.A., Zijlstra C. (1996) Physical localization of 5s rRNA genes in the pig by fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas*, vol. 124, pp. 95-97. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1996.00095.x>.

4-бөлім
ЗООЛОГИЯ

Section 4
ZOOLOGY

Раздел 4
ЗООЛОГИЯ

A.S. Assylbekova^{1*}, G.K. Barinova¹, G.A. Aubakirova¹,
A.B. Makhanbetova², Zh.B. Kuanchaleyev¹, S.E. Mussin¹,
A.D. Mussina¹

¹«S. Seifullin Kazakh Agro Technical University», Kazakhstan, Nur-Sultan

²Joint-Stock Company “Republican Center for Breeding
in Animal Husbandry” AsylTulik”, Kazakhstan, Kosshy

*e-mail: gamily-05@mail.ru

CRYOPRESERVATION OF REPRODUCTIVE CELLS OF MALE RUSSIAN STURGEON

Currently, cryopreservation of sperm is recognized as one of the promising ways to preserve the genetic diversity of fish, not only rare and endangered species, but also aquaculture objects. Scientific research was carried out in the scientific research center “Fisheries” of the S. Seifullin Kazakh Agro Technical University and the JSC “Republican Center for livestock breeding “Asyl Tulik” in 2022. The purpose of the research was to study methods of cryopreservation of Russian sturgeon sperm using cryoprotectors using dimethyl sulfide oxide with a concentration of 5% and 10% and methanol with a concentration of 3% and 8%. In the course of the research, generally accepted methods for assessing and freezing the sperm of the studied object were used. During the experimental work, the method of freezing the reproductive cells of the Russian sturgeon with a 15-minute exposure to -21 °C in a box with subsequent immersion in a Dewar vessel was studied. The survival and lifetime of spermatozoa after defrosting were also studied. According to the results of the assessment of the quality of defrosted sperm of the Russian sturgeon, it was found that the most effective cryoprotective medium for cryopreservation is based on methanol with a concentration of 8%. The number of spermatozoa with translational movements in the three groups ranged from 23.8% to 31.2%. At the same time, the lifetime of spermatozoa in this cryoprotective medium was 118s. Methanol with a concentration of 8% provides the best resistance to oxidative stress experienced by cells during freezing. The results of the research make it possible to create a cryobank of the Russian sturgeon gene pool at fish hatcheries to preserve genetic diversity.

Key words: cryopreservation, cryoprotector, reproductive cells, sperm, Russian sturgeon.

A.C. Асылбекова^{1*}, Г.К. Баринаова¹, Г.А. Аубакирова¹,
А.Б. Маханбетова², Ж.Б. Куанчалеєв¹, С.Е. Мусин¹, А.Д. Мусина¹

¹«С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» КеАҚ, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

²«Асыл түлік» Республикалық мал шаруашылығын асылдандыру орталығы» АҚ, Қазақстан, Қосшы қ.

*e-mail: gamily-05@mail.ru

Орыс бекіресі аталықтарының репродуктивті жасушаларының криоконсервациясы

Қазіргі уақытта сирек кездесетін және жойылып бара жатқан түрлердің ғана емес, сонымен қатар аквакультура объектілерінің де балықтардың генетикалық әртүрлілігін сақтаудың перспективті жолдарының бірі шәуетті криоконсервациялау болып табылады. Ғылыми зерттеулер 2022 жылы «С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің» «Балық шаруашылығы» ғылыми-зерттеу орталығында КеАҚ және «Асыл түлік» республикалық мал шаруашылығын асылдандыру орталығы» АҚ жүргізілді. Ғылыми зерттеулердің мақсаты 5% пен 10% концентрациясы бар диметилсульфидоксид және 3% пен 8% концентрациясы бар метанол негізіндегі криопротекторларды қолдана отырып, орыс бекіресінің шәуетін криоконсервациялау әдістерін зерттеу болып табылды. Зерттеу барысында зерттелетін объектінің шәуетін бағалау және мұздату бойынша жалпы қабылданған әдістер қолданылды. Эксперименттік жұмыстарды жүргізу кезінде орыс бекіресінің репродуктивті жасушаларын 15 минут -21°С дейін ұстап, кейіннен Дьюар ыдысына батырып қатыру әдісі зерттелді. Сондай-ақ, дефростациядан кейін сперматозоидтардың өмір сүру деңгейі мен өмір сүру уақыты зерттелді. Орыс бекіресінің дефростирленген шәуетінің сапасын бағалау нәтижелері бойынша криоконсервациялау үшін 8% концентрациясы бар метанол негізіндегі криокорғау ортасы неғұрлым тиімді болып табылатыны

анықталды. Үш топ бойынша ілгерілемелі қозғалысы бар сперматозоидтардың саны 23,8%-дан 31,2%-ға дейін ауытқыды. Сонымен қатар, осы криопротекторлық ортаны қолдана отырып, сперматозоидтардың өмір сүру уақыты 118 с құрады, 8% концентрациясы бар метанол мұздату кезінде жасушалар бастан кешіретін тотығу стрессіне жақсы қарсылықты қамтамасыз етеді. Зерттеу нәтижелері генетикалық әртүрлілікті сақтау үшін балық зауыттарында орыс бекіресінің гендік қорының криобанкін құруға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: криоконсервация, криопротектор, репродуктивті жасушалар, шәует, орыс бекіресі.

А.С. Асылбекова^{1*}, Г.К. Баринаова¹, Г.А. Аубакирова¹,
А.Б. Маханбетова², Ж.Б. Куанчалева¹, С.Е. Мусин¹, А.Д. Мусина¹

¹НАО «Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина», Казахстан, г. Нур-Султан

²АО «Республиканский центр по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік», Казахстан, г. Косшы

*e-mail: gamily-05@mail.ru

Криоконсервация репродуктивных клеток самцов русского осетра

В настоящее время одним из перспективных путей сохранения генетического разнообразия рыб не только редких и исчезающих видов, но и объектов аквакультуры признана криоконсервация спермы. Научные исследования проводились в научно-исследовательском центре «Рыбное хозяйство» НАО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина» и в АО «Республиканский центр по племенному делу в животноводстве «Асыл түлік» в 2022 году. Целью научных исследований являлось изучить методы криоконсервации спермы русского осетра с использованием криопротекторов на основе диметилсульфидоксида с концентрацией 5% и 10% и метанола с концентрацией 3% и 8%. В ходе исследований были использованы общепринятые методики по оценке и заморозке спермы исследуемого объекта. При проведении экспериментальных работ изучен метод замораживания репродуктивных клеток русского осетра с 15-минутной выдержкой в ящике до -21°C с последующим погружением в сосуд Дьюара. Также были изучены выживаемость и время жизни сперматозоидов после дефростации. По результатам оценки качества дефростированной спермы русского осетра было установлено, что наиболее эффективным для криоконсервации является криозащитная среда на основе метанола с концентрацией 8%. Количество сперматозоидов с поступательными движениями по трем группам колебалось в пределах от 23,8% до 31,2%. При этом время жизни спермиев с использованием данной криозащитной среды составило 118 с. Метанол с концентрацией 8% обеспечивает наилучшую устойчивость к окислительному стрессу, испытываемому клетками во время заморозки. Результаты исследований дают возможность создать криобанк генофонда русского осетра на рыбных заводах для сохранения генетического разнообразия.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротектор, репродуктивные клетки, сперма, русский осетр.

Introduction

The Caspian Sea is the richest reservoir in the world in terms of the abundance and number of sturgeon species. Of the 26 known species of sturgeon, 6 live here – beluga (*Huso huso*), Russian sturgeon (*Acipenser güldenstädtii*), Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*), sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*), barbel sturgeon (*Acipenser nudi-ventris*). The Russian sturgeon, stellate sturgeon and beluga are of the greatest commercial importance. Throughout the history of the Caspian fishery, sturgeon catches have varied significantly depending on the reproduction and intensity of fishing. The current catastrophic decline in the number of sturgeon in the Caspian Sea, due to irrational fishing, reduc-

tion of migration routes and natural reproduction, determines the need to take effective measures to preserve them. These measures should take into account the species-specific adaptation complexes and migration mechanisms of sturgeon. The discovery of the patterns of the formation of sturgeon populations living in the Caspian Sea is crucial not only for the preservation of natural reproduction, but also for the improvement of the biotechnics of industrial sturgeon breeding[1-5].

Currently, the increasing anthropogenic impact on aquatic ecosystems not only affects the physiological state of aquatic organisms, but also leads to a decrease in the number of species. This is especially noticeable on such species as sturgeon, whitefish (endemic to the Caspian Sea), walleye, etc. If earlier Russian sturgeon, stellate sturgeon and beluga,

as well as barbel sturgeon in the Caspian and Azov basins had commercial significance, nowadays their capture is prohibited. Beluga and stellate sturgeon in these reservoirs have become so rare that they have become endangered species, and the populations of Russian sturgeon have sharply decreased. At present, the barbel sturgeon and the native species of the Caspian Sea, the inconnu, can be attributed to rare species, the number of which has decreased to a critically low level [6-8].

Preservation and increase of stocks of rare and endangered species of fish is possible only with the development of factory breeding. However, the efficiency of population recruitment based on artificial reproduction is reduced due to a sharp decrease in the number of producers [9]. There is a need to develop various approaches to the use and preservation of the population gene pool of natural generation producers for the purposes of artificial reproduction. Cryobiotechnology methods for hydrobionts have been actively used for the last 10-15 years and the effectiveness of their implementation with a reduction in the number of natural populations and a shortage of producers can be quite high [10-11].

Cryopreservation remains one of the most effective and rapidly developing areas for preserving the genetic diversity of fish, not only rare and endangered species, but also aquaculture objects. The presence of genetically representative collections of fish genomes from breeding herds at sturgeon hatcheries and from natural populations in the cryobank makes it possible to preserve the genetic diversity of these valuable commercial objects with maximum effect [12-13]. Cryopreservation of biological objects involves a certain composition of the preserving solution as well as freezing and defrosting conditions. In the experiments of foreign scientists on the cryopreservation of fish sperm, the preserving solution is a cryoprotective medium, which is a solution of a cryoprotector in a diluent. Cryoprotectors are understood to be cryoprotectors penetrating through the cell membrane, such as glycerin, ethylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, dimethylacetamide, etc., while non-penetrating cryoprotectors (most often sucrose) are part of the diluent [14-22].

The aim of the research is to study methods of cryopreservation of Russian sturgeon sperm using a cryoprotective medium based on DMSO and methanol with different concentrations.

Materials and methods of research

The research was conducted in 2021-2022 at the scientific research center "Fisheries" of the Department of Hunting and Fisheries, S.Seifullin Kazakh Agro Technical University. The research material was the sperm of a Russian sturgeon (*Acipenser guldensstädtii*), harvested at the Ural-Atyrau sturgeon hatchery during the spawning campaign. Also, the biomaterial after freezing was studied for quality in the laboratory of JSC "Republican Center for livestock breeding "Asyl Tulik".

When studying the quality of sperm, a visual assessment was carried out by color and consistency directly during roe straining. The quality of sperm was determined by the number of sperm with translational movement and the lifetime of sperm after its activation. A drop of sperm was applied to the microscopic slide, then diluted with water in a ratio of 1:300, thereby activating sperm cells. For cryopreservation, sperm with a mobility of 90-100% was used.

Low-temperature preservation of reproductive cells of male Russian sturgeon was carried out according to the generally accepted method [13]. However, in the cryoprotective solution, the content of cryoprotectors and the introduction of the base solution were adjusted due to the fact that the Russian sturgeon was chosen as the object of the study. During the freezing process, several cryosolutions containing a multicomponent base solution of 0.1% sucrose, 0.08% potassium chloride, 5-10% dimethyl sulfoxide (DMSO) or 3-8% methanol were used. The cryosolution was prepared in a cool room 16-18°C. The seminal fluid was mixed with a 1:1 cryomedium, and then frozen.

Defrosting of cryovials with cryopreserved sperm was carried out in a water bath at a temperature of 38-40°C for 1 minute. The mobility of defrosted sperm was recorded on a personal computer monitor using a video setup under a microscope at magnification from 180 to 400 times when activated with distilled water.

The following materials were used for the experimental work: a Dewar vessel for storing biological material in nitrogen, a trinocular microscope with a camera and CEROS software of CASA computer technology (IMV-technologies, France) for assessing the quality of defrosted fish sperm, a microscope at x40 magnification for

assessing the quality of native sperm, cryovials, a water bath, a stopwatch, a micropipette. During freezing, Eppendorf cryovials with a volume of 0.2ml and 0.9ml and polypropylene straws with a volume of 0.25ml were used.

Statistical processing was carried out according to the guidance of G.F. Lakin [23] and on a PC using the Excel program [24].

Research results and their discussions

To conduct research after assessing the quality of freshly obtained sperm, groups of fish were formed, which included 2-3 males. Before freezing, semen cooled to 10-12°C was diluted with a cryoprotective medium cooled to the same temperature in a volume ratio of 1:1. The medium was added slowly, drop by drop, with continuous stirring. The resulting suspension of sperm – cryoprotective medium was poured into cryovials with a volume of 0.2-0.9 ml for 5-10 minutes. The cryovials were placed on a raft of foam with a size of 14.5 x 14.3 cm with

a thickness of 4 cm. Next, the raft was immersed in a foam box measuring 33.5 x 21cm, 26cm high from the outside and 20cm inside filled with liquid nitrogen. The raft with cryovials was kept for 15 minutes until the temperature dropped to -21 °C, then all cryovials were transferred to a Dewar vessel for long-term storage at a temperature of -196°C .

The speed and methods of freezing are of great importance, using a programmable freezer for cryopreservation of Persian sturgeon sperm (*Acipenser persicus*) in the cryoprotective medium MT (modified Flower diluent) + 10% methanol, the authors achieved the best results at a maximum freezing rate of - 40°C/min [25]. We used the field method of freezing on a raft proposed by Russian scientists.

Sperm defrosting was carried out by removing test tubes with frozen sperm from liquid nitrogen and placing them in a water bath with a temperature of 38-40°C, then activated with distilled water. The number of motile spermatozoa and the lifetime were determined in defrosted samples (Table 1).

Table 1 – Results of cryopreservation of Russian sturgeon sperm

Group of fish	Sperm volume, ml	Mobility of defrosted sperm, %			
		DMSO 10%	DMSO 5%	Methanol 3%	Methanol 8%
1 (semen mixture of 3 males)	20 ml	10,2±0,3	24,3±0,24	22,1±0,18	31,2±0,12
2 (semen mixture of 2 males)	14 ml	7,4±0,11	14,3±0,21	12,6±0,16	23,8±0,17
3 (a mixture of sperm from 3 males)	17 ml	8,6±0,14	18,6±0,2	19,3±0,13	27,2±0,26

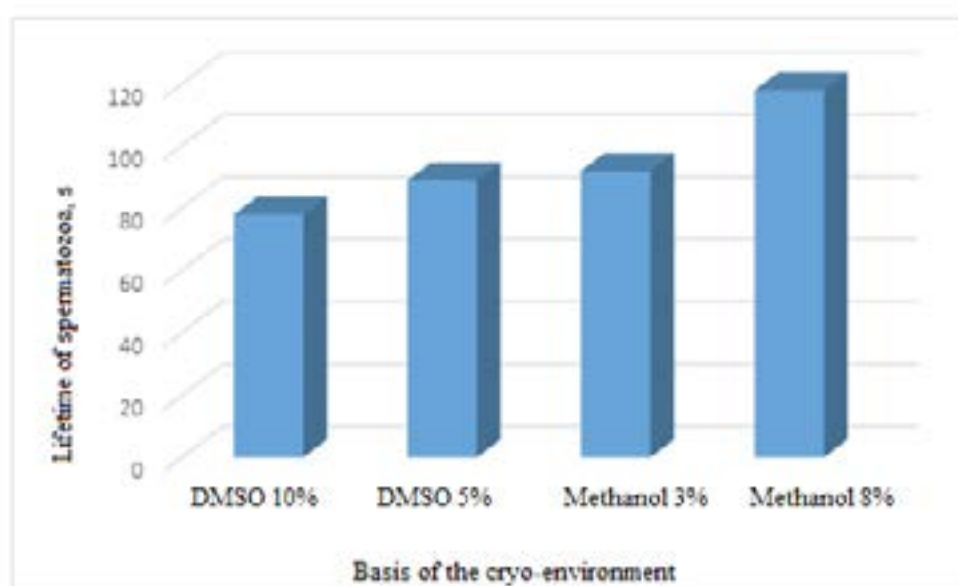


Figure 1 – The time of activity of Russian sturgeon sperm, s

Special attention during the main research was paid to optimizing the qualitative and quantitative composition of the protective medium as the most important factor in ensuring the protection of spermatozoa from the damaging effects of low temperatures. The authors, based on their results, found that methanol is the most suitable cryoprotector for sperm of sturgeon fish (sterlet), providing the best resistance to oxidative stress [26].

In the experiments on cryopreservation of Russian sturgeon sperm, 4 types of cryoprotective medium were used: DMSO with a concentration of 5%, 10%, methanol with a concentration of 3%, 8%. The motility of sperms after defrosting was studied. High results were obtained when using DMSO with a concentration of 5% and methanol with a concentration of 8%, where sperm motility was in the range of 14.3-24.3% and 23.8-31.2%, respectively. In this regard, when comparing the use of DMSO, a high effect was obtained when using DMSO with a concentration of 5%, and when using methanol with a concentration of 8%.

According to the average values of the cryoprotective medium, graphs of the lifetime of sperms after defrosting were constructed. Figure 1 shows that different compositions of the cryoprotective medium act on spermatozoa in different ways. The greatest activity of sperm was shown under the action of methanol at a concentration of 8% and amounted to 118s. When conducting experiments using DMSO, the highest result was obtained when used at a concentration of 5%, which is 12% higher than using DMSO with a concentration of 10%. When using a cryomedium based on methanol with a concentration of 8%, the result was 22% higher than methanol with a concentration of 3%. According to the conducted experiments, the optimal cryoprotective medium is methanol 8%.

Conclusion

In the conducted studies, a field method of freezing the sperm of Russian sturgeon was used with 15 minutes in a box on rafts up to -21°C with subsequent immersion in a Dewar vessel. This raft method showed a good result, where the survival rate of motile spermatozoa ranged from 7.4 to 31.2%.

When assessing the quality of the defrosted sperm of the Russian sturgeon, it was found that the cryoprotective medium based on methanol with a concentration of 8% is the most effective for cryopreservation. The number of sperm with translational movements in the three groups ranged from 23.8% to 31.2%. At the same time, the lifetime of spermatozoa in this cryoprotective medium was 118s.

Conflict of interest

All authors have read and are familiar with the content of the article and have no conflict of interest.

Note of acknowledgment

The authors of the article express their gratitude to the management of the Ural-Atyrau Sturgeon Hatchery for providing assistance in obtaining Russian sturgeon sperm during the spawning period.

Source of funding

The work was carried out within the framework of the grant funding project for young scientists on scientific and technical projects for 2021-2023 No. AP09058175 on the topic «Creation of a cryobank of reproductive cells of valuable fish species of Kazakhstan».

References

- 1 Lepilina I.N., Vasilyeva T.V., Abdusamadov A.S. The state of Caspian sturgeon stocks in a long-term aspect (literary review) // South of Russia: ecology, development. 2010. Vol. 5, N3. Pp. 57-65. DOI:10.18470/1992-1098-2010-3-57-65
- 2 Vasilyeva L.M., Smirnova N.V., Yusupova A.Z. On the issue of conservation and restoration of sturgeon stocks in the Volga-Caspian basin // South of Russia: ecology, development. 2012. Vol. 7, N1. Pp. 73-76. DOI:10.18470/1992-1098-2012-1-73-76
- 3 Matishov G.G., Ponomareva E.N., Belaya M.M. Preservation of the genetic diversity of fish by low-temperature canning methods // Fisheries. 2012. № 3. Pp. 59-62
- 4 Matishov G.G., Balykin P.A., Ponomareva E.N. Russia's fishing industry and aquaculture // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2012. Vol. 82, N1. Pp. 55-62.
- 5 Khodorevskaya R.P., Kalmykov V.A., Zhilkin A.A. The current state of sturgeon stocks in the Caspian basin and measures for their conservation. Bulletin of the AGTU. Series: Fisheries. 2012. № 1. Pp.99-106
- 6 Bapsanova, A.M. Cryopreservation of genetic material for the conservation of rare and endangered animal species / A.M. Bapsanova // International Journal of Applied and Fundamental Research. – 2012. – No. 1. – p. 79.

- 7 Ananyev, V.I. On the issue of creating a national system of gene pool collections of fish and other aquatic organisms in Russia for aquaculture and the conservation of rare and endangered species: legal and regulatory and methodological aspects / V.I. Ananyev, M.S. Manokhin // Veterinary pathology. – 2007. – No. 1. – S. 19-24.
- 8 Belaya M.M., Krasilnikova A.A., Ponomareva E.N. Developments of the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences in the field of cryopreservation of fish reproductive cells / Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, vol. 20, No. 5(2), 2018 – P 280-286.
- 9 Karamuldaeva A.K., Tikhomirov A.M. The use of glycerin for cryopreservation of white salmon sperm. Bulletin of ASTU. Series: Fisheries. 2017. No. 2. pp.117-121
- 10 Ponomareva E.N., Krasilnikova A.A., Tikhomirov A.M., Firsova A.V. New biotechnological methods for cryopreservation of reproductive cells of sturgeon species // Animal Ecology, v.11, No. 1, 2016. – P.59-68
- 11 Chipinov, V.G. Economic efficiency of the use of cryopreserved sperm in the cultivation of sturgeon species / V.G. Chipinov, M.M. Bogatyreva // Actual problems of ensuring food security in the south of Russia: innovative technologies for the conservation of bioresources, soil fertility, melioration and water supply: proceedings of the International Scientific Conference (September 27-30, 2011, Rostov-on-Don). – Rostov-on-Don: Publishing House of the YuNTs RAS, 2011. – P. 133-135.
- 12 Ponomareva E.N., Bogatyreva M.M., Antonova N.A., Osipova V.P. Optimization of the process of cryopreservation of sturgeon sperm using various media // Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, vol. 11, No. 1 (2), 2009. – P. 132-134
- 13 Dokina O.B., Tsvetkova L.I., Pronina L.D., Milenko V.A. Method of cryopreservation of sperm of sturgeons – objects of aquaculture. Sturgeon Aquaculture: Achievements and Development Prospects: Proceedings of the IV International Scientific and Practical Conference, March 13-15, 2006 Astrakhan. – M.: VNIRO Publishing House, 2006, S.76-79
- 14 Huang B. X.-R. et al. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) semen // J. Appl. Ichthyol. – 2014. – V. 30. – P. 1585-1589.
- 15 Dzyuba B. et al. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterlet *Acipenser ruthenus* during sequential stripping // Aquaculture, 2012. – V. 356-357. – P. 272-278.
- 16 Dzyuba B. et al. Motility and fertilization ability of sterlet *Acipenser ruthenus* testicular sperm after cryopreservation // Cryobiology. – 2014. – V. 69. – P. 339-341.
- 17 Horvath A., Chevre P., Urbanyi B. Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on *A. sturio*: chap. 35 // In: Biology and conservation of the European sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758: the reunion of the European and Atlantic sturgeons. Ed. by Williot P., Rochard E., DesseBerset N., Kirschbaum F., Gessner J. / Heidelberg, NLD: Springer, 2011. – P. 465-476.
- 18 Aramli M. S., Nazari R. M., Gharibi M. R. Effect of post-thaw storage time on motility and fertility of cryopreserved beluga sturgeon (*Huso huso*) sperm // Reprod. Domest. Anim. – 2015a. -v. 50.-P. 349-352.
- 19 Sadeghi A. et al. Cryopreservation of stellate (*Acipenser stellatus*) sperm: Effect of different concentrations of DMSO and dilution dates on sperm mobility and motility duration after longterm storage // Global Veterinaria. — 2013. – V. 10. – P. 26-30.
- 20 Boryshpolets S. et al. Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants // Journal of Applied Ichthyology. — 2011. — V. 27. — P. 1147–1149.
- 21 Judycka S. et al. New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) semen // Cryobiology. – 2015. – Feb 25. pii: S0011-2240 (15) 00 033–4.
- 22 Manual on sturgeon reproduction / Coppen International bv, Helmont, The Netherlands, 2007. – Special Issue. – 40 p.
- 23 Lakin G.F. Biometrics – M.: Higher School, 1990.-352 p.
- 24 Korosov A. V., Gorbach V. AT. Computer processing of biological data. -Petrozavodsk: PetrGU Publishing House, – 2007, -76 p.
- 25 Aramli M. S. et al. Effectiveness of glucose-methanol extender for cryopreservation of *Husohuso* spermatozoa // Anim. Reprod. Sci. – 2015. – V. 162. – P. 37-42.
- 26 Shaliutina-Kolešová A. et al. The influence of cryoprotectants on sturgeon (*Acipenser ruthenus*) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress // Anim. Reprod. Sci. – 2015. – V. 159. – P. 66-76.

References

- 1 Anan'ev, V.I. K voprosu o sozdanií nacional'noj sistemy genofondnyh kollekcij ryb i drugih gidrobiontov Rossii dlja akvakul'tury i sohraneniya redkih i ischezajushhih vidov: pravovye i normativnometodologicheskie aspekty / V.I. Anan'ev, M.S. Manohina // Veterinarnaja patologija. – 2007. – № 1. – S. 19-24.
- 2 Aramli M. S. et al. Effectiveness of glucose-methanol extender for cryopreservation of *Husohuso* spermatozoa // Anim. Reprod. Sci. – 2015. – V. 162. – P. 37-42.
- 3 Aramli M. S., Nazari R. M., Gharibi M. R. Effect of post-thaw storage time on motility and fertility of cryopreserved beluga sturgeon (*Husohuso*) sperm // Reprod. Domest. Anim. – 2015a. -V. 50. -P. 349-352.
- 4 Bapsanova, A.M. Kriokonservacija geneticheskogo materiala dlja sohraneniya redkih i ischezajushhih vidov zhivotnyh / A.M. Bapsanova // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. – 2012. – № 1. – S. 79.
- 5 Belaja M.M., Krasil'nikova A.A., Ponomareva E.N. Razrabotki juzhnogo nauchnogo centra RAN v oblasti kriokonservacii reproduktivnyh kletok ryb / Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk, t. 20, № 5(2), 2018 – S 280-286.
- 6 Boryshpolets S. et al. Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants // Journal of Applied Ichthyology. — 2011. — V. 27. — P. 1147–1149.

- 7 CHipinov, V.G. JEkonomicheskaja jeffektivnost' ispol'zovanija kriokonservirovannoj spermy pri vyrashhivanii osetrovyh vidov ryb / V.G. CHipinov, M.M. Bogatyreva // Aktual'nye problemy obespechenija prodovol'stvennoj bezopasnosti juga Rossii: innovacionnye tehnologii dlja sohraneniya bioresursov, plodородija pochv, melioracii i vodoobespechenija: materialy Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii (27-30 sentjabrja 2011 g., Rostov-na-Donu). – Rostov-na-Donu: Izd-vo JUNC RAN, 2011. – S. 133-135.
- 8 Dokina O.B., Cvetkova L.I., Pronina L.D., Milenko V.A. Metod kriokonservacii spermy osetrovyh ryb – ob#ektov akvakul'tury. Akvakul'tura osetrovyh ryb: dostizhenija i perspektivy razvitija: Materialy dokladov IV Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoi konferencii, 13-15 marta 2006 g. Astrahan'. – M.: Izd-vo VNIRO, 2006, S.76-79
- 9 Dzyuba B. et al. Motility and fertilization ability of sterletAcipenserruthenus testicular sperm after cryopreservation // Cryobiology. – 2014. – V. 69. – P. 339-341.
- 10 Dzyuba B. et al. Spermatozoa motility, cryoresistance, and fertilizing ability in sterletAcipenserruthenus during sequential stripping // Aquaculture, 2012. – V. 356-357. – P. 272-278.
- 11 Hodorevskaja R.P., Kalmykov V.A., ZHilkin A.A. Sovremennoe sostojanie zapasov osetrovyh Kaspijskogo bassejna i mery po ih sohraneniu. Vestnik AGTU. Serija: Rybnoe hozjajstvo. 2012. № 1. S.99-106
- 12 Horvath A., Chevre P., Urbanyi B. Sperm cryopreservation in sturgeon with a special focus on A. sturio: chap. 35 // In: Biology and conservation of the European sturgeon Acipensersturio L. 1758: the reunion of the European and Atlantic sturgeons. Ed. by Williot P., Rochard E., DesseBerset N., Kirschbaum F., Gessner J. /Heidelberg, NLD: Springer, 2011. – P. 465-476.
- 13 Huang B. X.-R. et al. Effect of cryopreservation on the enzyme activity of Russian sturgeon (Acipensergueldenstaedtii Brandt & Ratzeburg, 1833) semen //J. Appl. Ichthyol. – 2014. – V. 30. – P. 1585-1589.
- 14 Judycka S. et al. New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (Acipenserbaerii) semen //Cryobiology. – 2015. – Feb25. pii: S0011-2240 (15) 00 033-4.
- 15 Karamuldaeva A.K., Tihomirov A.M. Primenenie glicerina dlja kriokonservacii spermy belorybicy. Vestnik AGTU. Serija: Rybnoe hozjajstvo. 2017. № 2. S.117-121
- 16 Korosov A. V., Gorbach V. V. Komp'juternaja obrabotka biologicheskikh dannyh. –Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU,– 2007, –76 s.
- 17 Lakin G.F. Biometrija – M.: Vyssh.shkola, 1990.-352 s.
- 18 Lepilina I.N., Vasil'eva T.V., Abdusamadov A.S. Sostojanie zapasov kaspijskikh osetrovyh v mnogoletnem aspekte (literaturnyj obzor) // JUg Rossii: jekologija, razvitie. 2010. T. 5, N3. S. 57-65. DOI:10.18470/1992-1098-2010-3-57-65
- 19 Manual on sturgeon reproduction / Coppen International bv, Helmont, The Netherlands, 2007. – Special Issue. – 40 p.
- 20 Matishov G.G., Balykin P.A., Ponomareva E.N. Russia's fishing industry and aquaculture // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2012. T. 82, N1. S. 55-62.
- 21 Matishov G.G., Ponomareva E.N., Belaja M.M. Sohranenie geneticheskogo raznoobrazija ryb metodami nizkotemperaturnogo konservirovanija // Rybnoe hozjajstvo. 2012. № 3. S. 59-62
- 22 Ponomareva E.N., Bogatyreva M.M., Antonova N.A., Osipova V.P. Optimizacija processa kriokonservacii spermy osetrovyh ryb pri ispol'zovanii razlichnyh sred //Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk, t.11, №1(2), 2009. – S.132-134
- 23 Ponomareva E.N., Krasil'nikova A.A., Tihomirov A.M., Firsova A.V. Novye biotehnologicheskie metody kriokonservacii reproduktivnyh kletok osetrovyh vidov ryb //JEkologija zhivotnyh, t.11, №1, 2016. – S.59-68
- 24 Sadeghi A. et al. Cryopreservation of stellate (Acipenserstellatus) sperm: Effect of different concentrations of DMSO and dilution dates on sperm mobility and motility duration after longterm storage // Global Veterinaria. — 2013. – V. 10. – P. 26-30.
- 25 Shaliutina-Kolešová A. et al. The influence of cryoprotectants on sturgeon (Acipenser ruthenus) sperm quality, DNA integrity, antioxidant responses, and resistance to oxidative stress // Anim. Reprod. Sci. – 2015. – V. 159. – P. 66-76.
- 26 Vasil'eva L.M., Smirnova N.V., JUsupova A.Z. K voprosu sohraneniya i vosstanovleniya zapasov osetrovyh ryb v Volgo-Kaspijskom bassejne // JUg Rossii: jekologija, razvitie. 2012. T. 7, N1. S. 73-76. DOI:10.18470/1992-1098-2012-1-73-76

Б.І. Барбол^{1,2 *} , Н.Н. Попов³ , А.М. Абдыбекова⁴ 

¹Институт Зоологии КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

³Атырауский филиал ТОО «КазЭкоПроект», Казахстан, г. Атырау

⁴ТОО «КазНИВИ», Казахстан, г. Алматы

*e-mail: bekzhan.barbol@zool.kz

СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ МОРСКОГО СУДАКА (*SANDER MARINUS* CUVIER, 1828) В МАНГИСТАУСКОМ ПОБЕРЕЖЬЕ СРЕДНЕГО КАСПИЯ

Хищные рыбы в водных экосистемах регулируют численность других видов, что ослабляет напряженность конкурентных отношений и стабилизирует сообщество. Судак относится к крупным пелагическим хищникам, которые при высокой численности эффективно выедают мелких и малоценных промысловых рыб, осуществляя биомелиоративную функцию в рыбной части сообщества.

В то же время судак пользуется большим спросом как на внешнем, так и на внутреннем рынке. Его мясо считается диетическим продуктом – жирность его минимальна. Пищевая ценность судака очень велика – содержание белков в нём превышает 18 %. В мясе судака присутствуют 20 аминокислот, 8 из которых – незаменимые (то есть не синтезируются организмом человека), кроме того, содержится масса минеральных веществ, необходимых человеку (фосфор, калий, йод, молибден, марганец и другие).

Необходимо также отметить, что в Казахстане вылавливается и идет на экспорт только обыкновенный судак, запасы которого истощаются. Поэтому в качестве альтернативы предполагается использовать морского судака. Биологические ресурсы морского судака и других морских видов рыб Каспийского моря эксплуатируются недостаточно, так как морское рыболовство в нашей стране плохо развито, а промысловая популяция этих видов рыб позволяет наращивать вылов в казахстанском секторе Каспийского моря. В данной работе даётся описание качественных характеристик морского судака, выловленного в исследовательских уловах Мангистауского побережья Среднего Каспия, также степень изученности этого вида в Каспийском море и других водоемах. В статье описана методика проведения полного биологического анализа рыб и представлена статистическая обработка данных. В работе дана характеристика следующим показателям: размерно-весовым, возрастным, соотношению полов. Рассчитана упитанность и определен темп размерного и весового роста у морского судака. По результатам этих исследований была выявлена высокая корреляционная связь между размерно-возрастным, размерно-весовым и весо-возрастным.

Ключевые слова: морской судак, побережье Среднего Каспия, длина, вес, упитанность, возраст.

B.I. Barbol^{1,2 *}, N.N. Popov³, A.M. Abdybekova⁴

¹Institute of Zoology KS MES RK, Kazakhstan, Almaty

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

³Atyrau branch of «KazEcoProject» LLP, Kazakhstan, Atyrau

⁴«KazSRVI» LLP, Kazakhstan Almaty

*e-mail: bekzhan.barbol@zool.kz

Population structure of sander marinus cuvier, 1828 in the Mangistau coast of the Middle Caspian

Predatory fish in aquatic ecosystems regulate the abundance of other species, which weakens the tension of competitive relations and stabilizes the community. Walleye refers to large pelagic predators, which, with a high number, effectively eat small and low-value commercial fish, performing a biomeliorative function in the fishing part of the community.

At the same time, pike perch is in great demand, both on the foreign and domestic market. Its meat is considered a dietary product – its fat content is minimal. The nutritional value of walleye is very high – the protein content in it exceeds 18%. Zander meat contains 20 amino acids, 8 of which are irreplace-

able (that is, they are not synthesized by the human body), and, in addition, contains a lot of minerals necessary for humans (phosphorus, potassium, iodine, molybdenum, manganese and others).

It should also be noted that in Kazakhstan, only ordinary pike perch is caught and exported, the reserves of which are being depleted. Therefore, as an alternative, it is supposed to use a sea walleye. The biological resources of sea pike perch and other marine fish species of the Caspian Sea are not sufficiently exploited, since marine fisheries in our country are poorly developed, and the commercial population of these fish species allows increasing the catch in water areas under the jurisdiction of Kazakhstan. This paper describes the qualitative characteristics of sea zander caught in the research catches of the Mangistau coast of the Middle Caspian, as well as the degree of study in the Caspian Sea and other water bodies. The article describes the methodology for conducting a complete biological analysis of fish and presents statistical data processing. The paper gives a description of the following indicators: size-weight, age, sex ratio. Calculated fatness and determined the rate of size and weight growth in sea zander. Based on the results of these studies, a high correlation was found between age and weight, age and size of fish, and size and weight.

Key words: Sea pike perch, Middle Caspian coast, length, weight, fatness, age.

Б.І. Барбол^{1,2,*}, Н.Н. Попов³, А.М. Абдыбекова⁴

¹ҚР БҒМ ҒК Зоология институты, Қазақстан, Алматы қ.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

³«КазЭкоЖоба» ЖШС Атырау филиалы, Қазақстан, Атырау қ.

⁴«КазҒЗБИ» ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: bekzhan.bربول@zool.kz

Орта Каспийдің Маңғыстаулық жағалауындағы теңіз көксеркесінің (*Sander marinus* cuvier, 1828) популяциялық құрылымы

Су экожүйелеріндегі жыртқыш балықтар басқа түрлерінің санын реттейді, бұл бәсекелестік қатынастардың шиеленісін әлсіретеді және қауымдастықты тұрақтандырады. Көксерке ірі пелагиялды жыртқыштарға жатады, олар көп мөлшерде ұсақ және құнсыз балықтармен қоректеніп отырып, балық қауымдастығында биомелиоративті функцияны жүзеге асырады.

Сонымен қатар, май мөлшері минималді болуына байланысты көксерке сыртқы және ішкі нарықта үлкен сұранысқа ие. Көксерке тағамдық құндылығы өте жоғары – ондағы ақуыз мөлшері 18%-дан асады. Көксерке етінде 20 аминқышқылдары бар, олардың 8-і алмастырылмайтын (яғни адам ағзасы синтезделмейді), сонымен қатар адамға қажет көптеген минералдар бар (фосфор, калий, йод, молибден, марганец және басқалары).

Сондай-ақ, Қазақстанда қорлары таусылып бара жатқан, кәдімгі көксерке ғана ауланып, экспортқа шығарылатынын атап өту қажет. Сондықтан балама ретінде теңіз көксеркесін пайдалану ұсынылады. Каспий теңізіндегі көксеркенің және басқа да теңіз балық түрлерінің биологиялық ресурстары жеткілікті түрде пайдаланылмайды, өйткені біздің елімізде теңіздік балық аулау жеткілікті деңгейде дамымаған және осы балық түрлерінің кәсіптік популяциясы Қазақстан юрисдикциядағы су айдындарында аулауды арттыруға мүмкіндік беріп отыр. Бұл жұмыста орта Каспийдің Маңғыстау жағалауында зерттеу жұмыстарын жүргізу мақсатында ауланған теңіз көксеркесінің сапалық сипаттамалары, сондай-ақ Каспий теңізі мен басқа да су айдындарында оның зерттелу дәрежесі сипатталған. Мақалада балықтың толық биологиялық талдауын жүргізу әдістемесі мен статистикалық мәліметтерді өңдеу жұмыстары толық сипатталған. Жұмыста келесі көрсеткіштердің сипаттамасы берілген: өлшем-салмақ, жас, жыныс арақатынасы. Теңіз көксеркесінің қондылығы, мөлшері, салмағының өсу қарқыны анықталды. Осы зерттеулердің нәтижелері бойынша балықтың жасы мен салмағы, жасы мен мөлшері, мөлшері мен салмағы арасында жоғары корреляция анықталды.

Түйін сөздер: көксерке, Орта Каспий жағалауы, ұзындығы, салмағы, семіздігі, жасы.

Введение

В первой половине XX столетия в Каспийском море морской судак был второстепенным объектом промысла. В 1936–1942 гг. его улов на Каспии составлял около 2,5 тыс. тонн в год [1,2]. В последующие годы численность морского судака на Каспии резко снизилась. Одной из

причин снижения численности морского судака является загрязнение его нерестилищ у берегов Азербайджана [3,4].

Кроме Каспийского моря морской судак встречается еще и северо-западной части Черного моря (в основном в Днепро-Бугском лимане, и в устьях впадающих рек). В Черном море морской судак малочислен, и в уловах встречается

в единичных экземплярах. Причины естественной низкой численности этого вида в Черном море неясны; в последние два-три десятилетия основным отрицательным фактором здесь являлось сильное загрязнение северо-западной части моря сточными водами промышленных предприятий и отходами сельскохозяйственного производства [5].

Морской судак имеет маленькие глаза, щеки без чешуи, клыки. Тело тёмного цвета. Спина и голова тёмно-коричневая. Спинные и хвостовой плавник тёмные. Диаметр глаза меньше ширины лба. Спинные плавники обычно не соприкасаются. В боковой линии 76-87 чешуй. В первой жаберной дуге 12-18 тычинок [3].

Морской судак -хищник, питается главным образом бычками, а также атериной и килькой, раками и крабом. Растет медленнее, чем обыкновенный судак. Половая зрелость наступает у большинства особей на 3-4 год жизни. Нерестится в апреле-мае у берегов на глубине от 2,5 до 15 метров, на каменистом грунте при температуре воды от 0 до 10° С. Липкая икра откладывается в «гнезда» – пещерки или на открытый каменистый грунт. Эмбриогенез продолжается 150-200 часов. Плодовитость 45-47 тысяч икринок [3].

В казахстанском секторе Каспийского моря этот вид мало изучен. Так, авторы нашли всего одну публикацию И.В. Орловой и А.С. Данько посвященную морскому судаку. Надо отметить, что ими было обследовано всего 51 экз. этого вида, выловленных в 2007 и 2010 гг около порта Актау. Также один экземпляр морского судака в 2010 году был выловлен на структуре «Нур-Султан» [6]. Поэтому изучение биологии морского судака в Казахстане весьма актуально. Необходимо также отметить, что ареал распространения морского судака, не охватывается исследованиями, в рамках программы государственного заказа по изучению состояния гидробионтов в казахстанском секторе Каспийского моря.

В Казахстане, в современный период, этот вид не используется промыслом, но является объектом любительского и спортивного рыболовства. В Азербайджане и на Украине морской судак занесён в Красную Книгу [7,8,9].

Материалы и методы исследований

Исследовательские работы проводились в 2018-2020 гг., в весенне-летние периоды на побережье Каспийского моря в Мангистауской области (таблица 1, рисунок 1). На семи точках

ихтиологического мониторинга с рыбацких лодок выставлялся порядок контрольных сетей, с размером ячеи 30,40 и 50 мм.

Таблица 1 – Станции ихтиологических наблюдений

№	Долгота	Широта
1	43°45'00	50°55'00
2	43°35'00	51°05'00
3	43°25'00	51°15'00
4	43°15'00	51°15'00
5	43°05'00	51°35'00
6	42°55'00	51°45'00
7	42°45'00	52°05'00

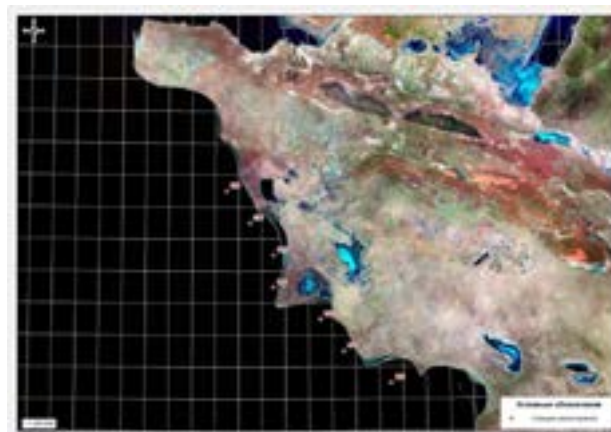


Рисунок 1 – Станции ихтиологических наблюдений

Сбор и обработка материала проводились согласно общепринятым в ихтиологии методикам [10,11]. Измерялась промысловая длина, определялся индивидуальный вес рыбы, фиксировалась стадия зрелости гонад. Возраст рыб определяли по чешуе, взятой выше боковой линии под спинным плавником, с помощью оптического прибора (бинокляр – МБС 10) в соответствии методики Н.Л. Чугунова [12]. Всего за период исследований взято на полный биологический анализ 150 экз. морского судака (таблица 1).

Таблица 1 – Объем собранного материала за 2018-2020 гг.

Годы	Количество
2018	50
2019	50
2020	50
Всего	150

Полученные результаты (первичные материалы полного биологического анализа) были подвергнуты статистической обработке по стандартным методикам [13,14]. Вычисления осуществляли с помощью программы «Microsoft Excel» и используя пакет программы МАКЕТ. Для описания зависимостей «длина-вес», «длина-возраст» и «масса-возраст» применили уравнение степенной функции [15]. Параметры линейного роста уравнения Бергаланфи [16] для морского судака получены с использованием пакета FSA ver. 0.8.32 [17], где β – коэффициент в уравнении роста.

Результаты исследований и их обсуждения

В настоящее время, к семейству окуневые, род – судаки, относится 5 видов рыб. Из них два вида, желтый и канадский судаки, обитают в Северной Америке. Ареалом распространения берша и обыкновенного судака являются водоёмы восточной Европы и Азии. Один вид – морской судак встречается только в Черном и Каспийском морях. В водоёмах Казахстана обитают 3

вида рыб, относящиеся к роду судаки. Обыкновенный судак встречается во всех крупных водоёмах Казахстана. Берша можно встретить в Жайык-Каспийском бассейне, в реках Жайык и Кигач. Морской судак обитает только вдоль побережья Мангистауской области, в реки он не заходит.

Морской судак ведет оседлый образ жизни, больших миграций не совершает. В теплое время года часто подходит к берегам, где становится легкой добычей для рыбаков любителей. Зимой уходит на глубину 30-50 метров [18-24].

По материалам наших исследований размеры морского судака в прибрежной зоне Мангистауской области изменялись от 22,6 до 37,0 см, составив в среднем 30,88 см и весом от 173 до 934 г, в среднем 497,8г. Необходимо отметить, что размерно-весовые показатели самок были немного выше по сравнению с самцами. Так средняя длина у самцов за период исследований составила 30,5 см, в то время как у самок – 31,3см. Средние показатели массы самцов составили 479,2 г, а у самок 519,0 г соответственно (таблица 2).

Таблица 2 – Размерно-весовые показатели морского судака в Мангистауской области за 2018-2020 гг.

Год	Размеры, см			Масса, г		
	Самцы	Самки	Оба пола	Самцы	Самки	Оба пола
2018	22,6-31,5 28,2±0,4	26,5-32,0 29,7±0,3	22,6-32,0 28,6±0,3	173-464 329,3±11,1	290-520 381,0±12,5	173-520 349,0±9,0
2019	25,0-35,0 31,2±0,5	23,0-37,0 31,9±0,5	23,0-37,0 31,6±0,4	261-934 534,6±28,6	190-776 541,3±21,3	190-934 538,1±17,4
2020	26,0-37,0 32,5±0,5	30,0-35,0 32,3±0,4	26,0-37,0 37,4±0,3	299-860 611,8±26,8	447-797 600,6±19,1	299-860 606,2±16,3
2018- 2020	22,6-37,0 30,5±0,3	23,0-37,0 31,3±0,3	22,6-37,0 30,9±0,2	173-934 479,2±18,7	190-797 519,0±15,1	173-934 497,1±12,1

* Вверху минимальные и максимальные показатели, внизу – средние.

Материалы по размерно-весовому составу полностью согласуются, с результатами исследований возрастного состава морского судака. Средний возраст этого вида постоянно повышался. Так в 2018 году средний возраст составил 4,22 лет, а в 2020 повысился до 5,68 лет. Данный показатель свидетельствует о стабильном состоянии численности популяции морского судака.

Продолжительность жизни морского судака по данным литературных источников может достигать 15 лет [25,26]. Однако, по материалам наших исследований возраст морского судака изменялся от 2 до 8 лет. Средний возраст за весь период наблюдений составил 5,06 лет. Основу уловов составили рыбы в возрасте 4-6 лет. Их доля в исследовательских уловах 74,0% (таблица 3).

Таблица 3 – Возрастной состав морского судака

Годы	Возраст, лет							Средний возраст
	2	3	4	5	6	7	8	
2018	2,0	18,0	42,0	32,0	6,0	-	-	4,22±0,13
2019	4,0	6,0	18,0	22,0	32,0	16,0	2,0	5,28±0,19
2020	-	4,0	16,0	20,0	34,0	20,0	6,0	5,68±0,18
2018-2020	2,0	9,3	25,3	24,7	24,0	12,0	2,7	5,06±0,18

Соотношение полов в популяции морского судака близко к отношению 1:1, хотя у рыб разных возрастных групп оно разнообразно (рисунок 2). Если рассматривать популяцию в целом, то количество самок в исследуемом периоде составило 48,0 %, а самцов – 52,0 %. Самцы преобладали в младших возрастных группах от 2 до 4 лет. Доля их в уловах по мере увеличения возраста, сокращалась. Максимальные значения (82,3 %) были

отмечены у трехлеток. В пятилетнем возрасте половое соотношение составило 1:1, начиная с 6 лет, самок становится больше чем самцов. В возрасте 8 лет, доля самцов становится минимальной и составляет 33,3%. Подобное соотношение полового состава в популяции объясняется тем, что самцы созревают раньше самок, раньше вступают в состав нерестового стада и обладают меньшей продолжительностью жизни.

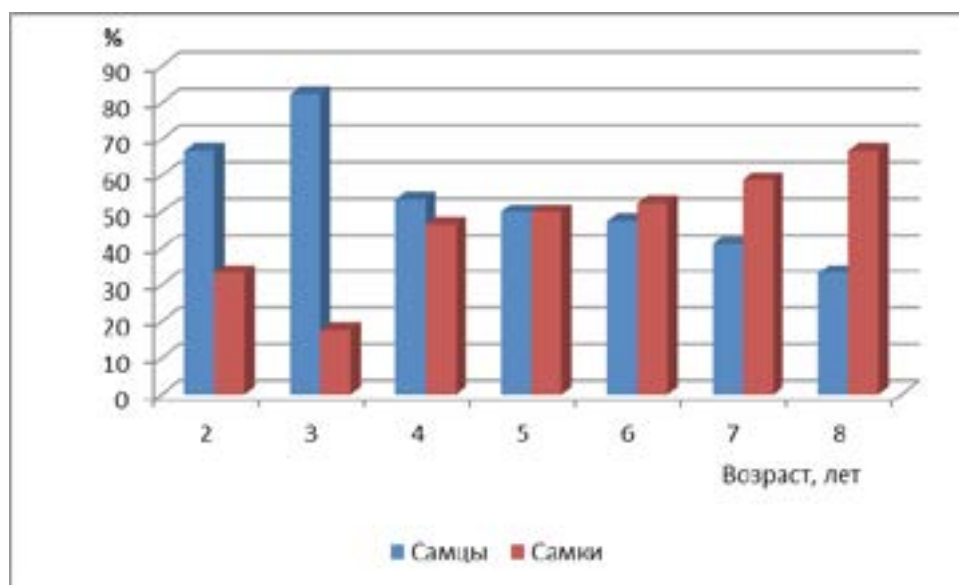


Рисунок 2 – Половая структура судака в зависимости от возраста.

Темпы весового и линейного роста у рыб неодинаковы и значительно изменяются в онтогенезе, что связано с возрастными особенностями обмена веществ. Учитывая, что коэффициент упитанности у рыб отражает соотношение между длиной и массой, мы вправе были ожидать его изменений у судака по мере

увеличения длины и возраста рыбы. Для выяснения этого вопроса нашли средние коэффициенты упитанности рыб, сгруппированные по возрасту. Полученные данные свидетельствуют о том, что с увеличением возраста коэффициент упитанности имеет тенденцию к возрастанию (рисунок 3).

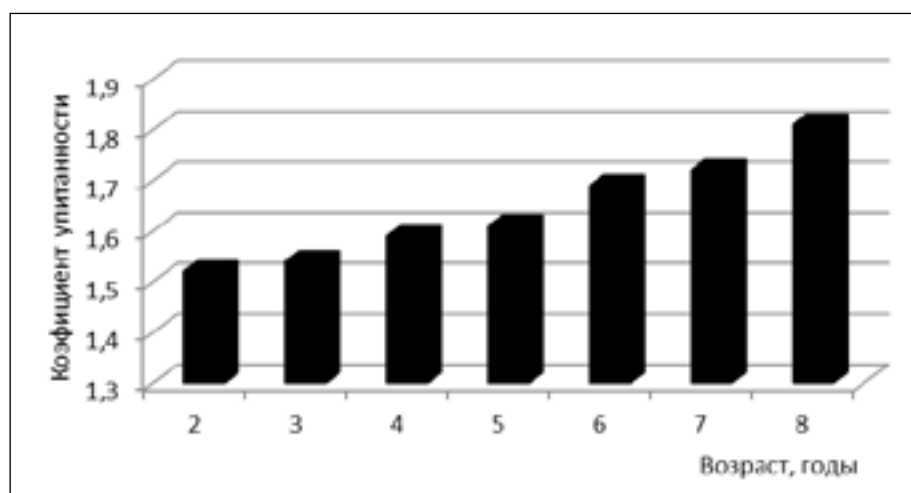


Рисунок 3 – Зависимость упитанности морского судака от его возраста (по Фультону)

На основании регрессионного анализа нами была установлена функциональная связь между размерно-возрастным, размерно-весовым и весо-возрастным показателем судака. Во всех случаях коэффициент детерминации был достаточно высоким. Зависимость длины от возраста аппроксимировали уравнением степенной функции роста, массы от возраста – экспоненциальной функцией, где коэффициенты детерминации были равны 0,88 и 0,91. Значения коэффициента β в степенном уравнении

роста – 0,3. Такое уравнение имеет вогнутую графическую форму, скорость роста с возрастом уменьшается. Снижение линейного роста у рыб старших возрастных групп объясняется тем, что у судака с возрастом увеличиваются затраты энергии на генеративный обмен, следовательно, увеличивается кормовой коэффициент, т. е. уменьшается эффективность использования пищи на рост. Сравнительный анализ линейного и весового роста представлен на рисунках 4 и 5.

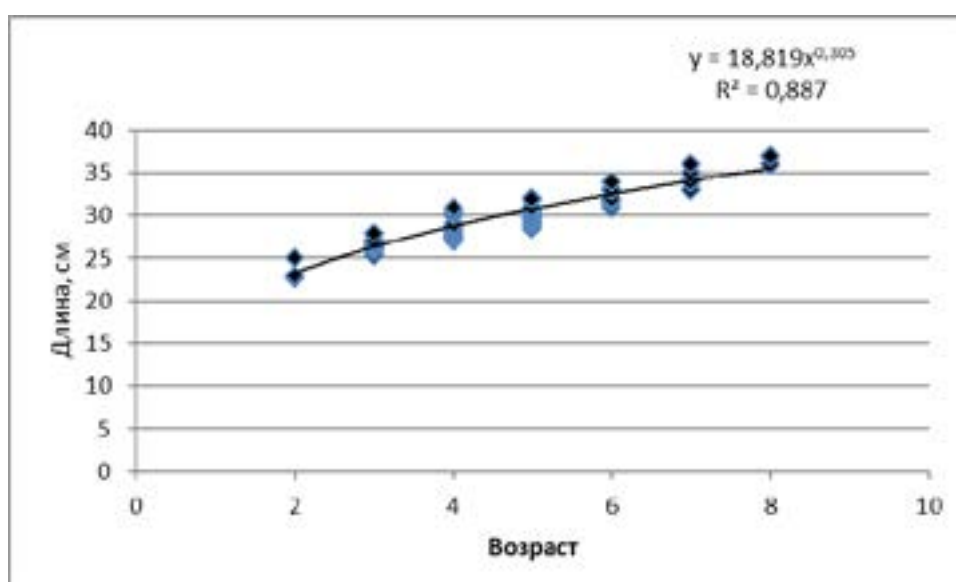


Рисунок 4 – Линейный рост морского судака в 2018–2020 гг.

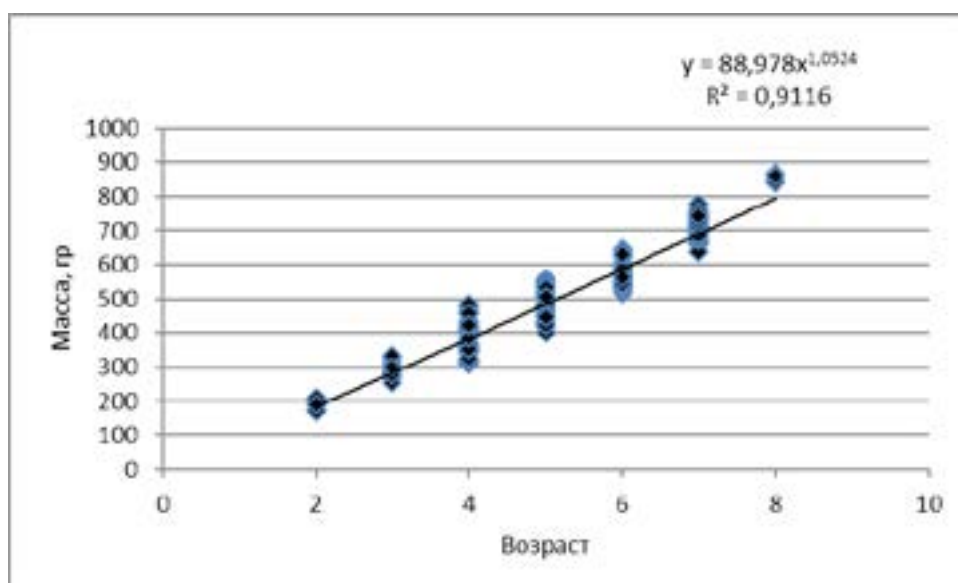


Рисунок 5 – Весовой рост морского судака в 2018–2020 гг.

С увеличением длины тела масса морского судака закономерно увеличивается. Сопряженное изменение средних значений массы и длины свидетельствует о тесной функциональной зависимости между этими показателями, при

этом коэффициент детерминации равен 0,90. Величина β в уравнении составляет 3,2. Это говорит о том, что весовой рост у рыб происходит в среднем в 3,2 раза интенсивнее линейного (рисунок 6).

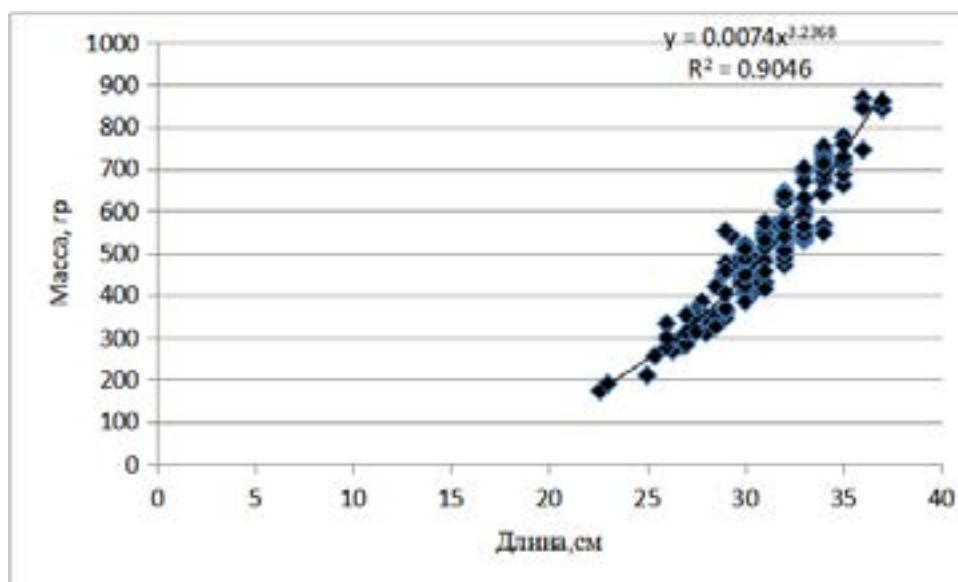


Рисунок 6 – Соотношение между длиной и массой тела морского судака в 2018–2020 гг.

Заключение. Таким образом, выполненные исследования позволили прийти к следующим выводам:

1. Размерно – весовые и возрастные показатели морского судака в исследовательских уловах стабильны и имеет тенденцию к увеличению.

2. Запасы морского судака в настоящее время находятся в благополучном состоянии, и промышленным рыболовством не используются.

3. Необходимо провести дополнительные исследования по изучению численности прибрежных видов в Мангистауской области (кутума, морского судака, сингиля) для определения их численности, биологических характеристик и возможной рекомендации морского судака к промышленному освоению.

Финансирование

Результаты, приведённые в статье получены в рамках целевого проекта по тематике: «Разработка национального электронного банка данных по научной зоологической коллекции Республики Казахстан, обеспечивающего их эффективное использование в науке и образовании» ИРН OR11465437.

Литература

- 1 Иванов, В.П. Биологические ресурсы Каспийского моря. – Астрахань, 2000. – С. 96.
- 2 <https://www.iucnredlist.org/species/20861/156765490>
- 3 Amiraliev NA, Askarova M, Opp C, Medeu A, Kulbekova R, Medeu AR. Water Quality Problems Analysis and Assessment of the Ecological Security Level of the Transboundary Ural-Caspian Basin of the Republic of Kazakhstan. Applied Sciences. 2022; 12(4):2059. <https://doi.org/10.3390/app12042059>
- 4 Amanda E. Haponski, Carol A. Stepien. Phylogenetic and biogeographical relationships of the Sander pikeperches (Percidae: Perciformes): patterns across North America and Eurasia. Biological Journal of the Linnean Society, Volume 110, Issue 1, September 2013, Pages 156–179, <https://doi.org/10.1111/bij.12114>
- 5 Мейтленд П.С., Линсел К., Сиделева В. Атлас рыб: Определитель пресноводных видов Европы. – СПб: ТИД Амфора. – 2009. – 287 с.
- 6 Орлова И.В., Данько А.С. О новых находениях морского судака *Sander marinus* в северо-восточной части Каспийского моря // Вестник КазНУ, серия биологическая. – Алматы. 4 (81) 2012. – С. 78-93.
- 7 Рыбы вод Украины // <http://kiev.ua/pages/ukrfish.htm>
- 8 Красная Книга Азербайджана. – Баку, 2013.
- 9 Abdusamadov A.S., Musayev P.G., Grigorian O.P., Barkhalov R.M., Akhmayev E.A., Taibov P.S. perspective directions of the fishing development in Tersko-Caspian fish industrial subregion. South of Russia: ecology, development. 2014;9(3):36-43. (In Russ.) <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2014-3-36-43>
- 10 Инструкция по сбору и первичной обработке материалов водных биоресурсов Каспийского бассейна и среды их обитания / под ред. Г.А. Судакова. – Астрахань: КаспНИРХ, 2011. – 193 с.
- 11 Правдин, И.Ф. Руководство по изучению рыб / И. Ф. Правдин. – М.: Пищ. промышленность, 1966. – 323 с.
- 12 Чугунов Н.Л. Руководство по изучению возраста и роста рыб. – М.: Изд. АН СССР, 1959. – 164 с.
- 13 Аксютин З.М. Элементы математической оценки результатов наблюдений в биологических и рыбохозяйственных исследованиях. – М.: Пищ. пром-сть, 1968. – 288 с.
- 14 Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. – М.: МГУ, 1980. – 150 с.
- 15 Винберг Г. Г. Скорость роста и интенсивность обмена у животных // Успехи современной биологии. – М., 1966. – Т. 61.
- 16 Bertalanffy L. 1964. Basic concepts in quantitative biology of metabolism // Helgoländer Wiss. Meeresunter. V. 9. P. 5–37.
- 17 Ogle, D.H., P. Wheeler, and A. Dinno. 2021. FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.8.32. (<https://github.com/droglenc/FSA>)
- 18 Богуцкая Н.Г., Кияшко П.В., Насека А.М., Орлова М.И. // Определитель рыб и беспозвоночных Каспийского моря. Т. 1. Рыбы и моллюски. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 543 с.
- 19 Ткаченко, П. В. О встречаемости морского судака *Sander marinus* (Cuvier, 1828) в районе Черноморского биосферного заповедника и юго-западной части Днепровско-Бугского лимана в последние 20 лет // ТНПУ, 2015. – Вып. 3/4 (64) : Специальный вып.: Гідроекологія. – С. 637–640.
- 20 Falahatkar, B., Efatpanah, I. & Kestemont, P. Pikeperch *Sander lucioperca* production in the south part of the Caspian Sea: technical notes. Aquacult Int 26, 391–401 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0222-2>
- 21 Guseynov M.K., Guseinov K.M., Gasanova A.S. caspian biological resources. South of Russia: ecology, development. 2015;10(2):38-53. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2015-2-38-53>
- 22 Abdybekova A.M., Abdibayeva A.A., Popov N.N., Zhaksylykova A.A., Barbol B.I., Bozhbanov B.Z., Torgerson P.R. Helminth Parasites of Fish of the Kazakhstan Sector of the Caspian Sea and Associated Drainage Basin. Helminthologia. 2020. 5;57(3):241-251. doi: 10.2478/helm-2020-0030
- 23 Ahmadnezhad, M., Oryan, S. H., Bahmani, M. and Sayad Bourani, M. Osmoregulatory capabilities of zander (*Sander lucioperca*) fingerlings in different salinities of the Caspian seawater. Iranian J. Fish. Sci., 2013. 13(2): 247-261.
- 24 Abdybekova, A., Assylbekova, S., Abdibayeva, A., Zhaksylykova, A., Barbol, B., Aubakirov, M., & Torgerson, P. (2021). Studies on the population biology of helminth parasites of fish species from the Caspian Sea drainage basin. Journal of Helminthology, 95, E12. doi:10.1017/S0022149X2100002X

- 25 Иванов В.П., Г.В. Комарова. Рыбы Каспийского моря. – Астрахань: Издательство АГТУ. 2012. – С. 256.
- 26 Sadeghi Bajgiran S, Pourkhabbaz A, Hasanpour M, Sinka Karimi M. A study on Zinc, Nickel, and Vanadium in fish muscle of *Alosa caspia* and *Sander lucioperca* and food risk assessment of its consumption in the southeast of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2016; 8 (4) :423-432

References

- 1 Abdusamadov A.S., Musayev P.G., Grigorian O.P., Barkhalov R.M., Akhmayev E.A., Taibov P.S. perspective directions of the fishing development in Tersko-Caspian fish industrial subregion. *South of Russia: ecology, development*. 2014;9(3):36-43. (In Russ.) <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2014-3-36-43>
- 2 Abdybekova A.M., Abdibayeva A.A., Popov N.N., Zhaksylykova A.A., Barbol B.I., Bozhbanov B.Z., Torgerson P.R.. Helminth Parasites of Fish of the Kazakhstan Sector of the Caspian Sea and Associated Drainage Basin. *Helminthologia*. 2020.5;57(3):241-251. doi:10.2478/helm-2020-0030
- 3 Abdybekova, A., Assylbekova, S., Abdibayeva, A., Zhaksylykova, A., Barbol, B., Aubakirov, M., & Torgerson, P. (2021). Studies on the population biology of helminth parasites of fish species from the Caspian Sea drainage basin. *Journal of Helminthology*, 95, E12. doi:10.1017/S0022149X2100002X
- 4 Ahmadnezhad, M., Oryan, S. H., Bahmani, M. and Sayad Bourani, M. Osmoregulatory capabilities of zander (*Sander lucioperca*) fingerlings in different salinities of the Caspian seawater. *Iranian J. Fish. Sci.*, 2013. 13(2): 247-261.
- 5 Aksyutina Z.M. Elements of mathematical evaluation of the results of observations in biological and fishery research. M.: Food industry, 1968. 288 p.
- 6 Amanda E. Haponski, Carol A. Stepien. Phylogenetic and biogeographical relationships of the Sander pikeperches (Percidae: Perciformes): patterns across North America and Eurasia. *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 110, Issue 1, September 2013, Pages 156–179, <https://doi.org/10.1111/bij.12114>
- 7 Amirgaliev NA, Askarova M, Opp C, Medeu A, Kulbekova R, Medeu AR. Water Quality Problems Analysis and Assessment of the Ecological Security Level of the Transboundary Ural-Caspian Basin of the Republic of Kazakhstan. *Applied Sciences*. 2022; 12(4):2059. <https://doi.org/10.3390/app12042059>
- 8 Bertalanffy L. 1964. Basic concepts in quantitative biology of metabolism // *Helgoländer Wiss. Meeresunter*. V. 9. P. 5–37.
- 9 Bogutskaya N.G., Kiyashko P.V., Naseka A.M., Orlova M.I. // Key to fish and invertebrates of the Caspian Sea. T. 1. Fish and shellfish. M.: Association of scientific publications KMK, 2013. – 543 p.
- 10 Chugunov N.L. Guide to the study of the age and growth of fish / Moscow: Ed. Academy of Sciences of the USSR, 1959. – 164 p.
- 11 Falahatkar, B., Efatpanah, I. & Kestemont, P. Pikeperch *Sander lucioperca* production in the south part of the Caspian Sea: technical notes. *Aquacult Int* 26, 391–401 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0222-2>
- 12 Fish of the waters of Ukraine // <http://kiev.ua/pages/ukrfish.htm>
- 13 Guseynov M.K., Guseinov K.M., Gasanova A.S. Caspian Biological Resources. *South of Russia: ecology, development*. 2015;10(2):38-53. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2015-2-38-53>
- 14 <https://www.iucnredlist.org/species/20861/156765490>
- 15 Instructions for the collection and primary processing of materials from aquatic bioresources of the Caspian basin and their habitat / ed. G.A. Sudakov. – Astrakhan: CaspNIRKH, 2011. – 193 p.
- 16 Ivanov V.P., G.V. Komarova. Fishes of the Caspian Sea. Astrakhan. Publishing house ASTU. 2012, p.-256.
- 17 Ivanov, V.P. Biological resources of the Caspian Sea – Astrakhan, 2000. P. 96.
- 18 Maitland P.S., Linsell K., Sideleva V. Atlas of fish: Key to European freshwater species. – St. Petersburg: TID Amphora. – 2009. – 287 p.
- 19 Ogle, D.H., P. Wheeler, and A. Dinno. 2021. FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.8.32. (<https://github.com/droglenc/FSA>)
- 20 Orlova I.V., Danko A.S. On new findings of the sea pike *Sander marinus* in the northeastern part of the Caspian Sea. *Bulletin of KazNU, biological series*. Almaty. 4 (81) 2012, pp. 78-93.
- 21 Plokhinsky N.A. Biometry algorithms. M.: MGU, 1980. 150 p.
- 22 Pravdin, I.F. Guide to the study of fish / I. F. Pravdin. – M.: Food industry, 1966. – 323 p.
- 23 Red Book of Azerbaijan, Baku. 2013.
- 24 Sadeghi Bajgiran S, Pourkhabbaz A, Hasanpour M, Sinka Karimi M. A study on Zinc, Nickel, and Vanadium in fish muscle of *Alosa caspia* and *Sander lucioperca* and food risk assessment of its consumption in the southeast of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2016; 8(4):423-432
- 25 Tkachenko, P. V. Occurrence of the sea pike *Sander marinus* (Cuvier, 1828) in the area of the Black Sea Biosphere Reserve and the southwestern part of the Dnieper-Bug Estuary in the last 20 years // *TNPU*, 2015. – Vip. 3/4 (64): Special edition: Hydroecology. – S. 637-640.
- 26 Vinberg G. G. Growth rate and metabolic rate in animals // *Successes of modern biology*. – Moscow, 1966. – T.61.

FTAMP 68.37.31, 68.37.13

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v92.i3.013>У.Т. Жуматаева^{1*}, Б.А. Дуйсембеков²¹М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Қазақстан, Шымкент қ.²Ж. Жиенбаев атындағы «Қазақ өсімдік қорғау

және карантин ғылыми-зерттеу институты» Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: doni_uli@mail.ru

АЗИЯЛЫҚ ШЕГІРТКЕ ДЕРНӘСІЛДЕРІНІҢ САН МӨЛШЕРІН ТИІМДІ ТӨМЕНДЕТУ ҮШІН ИНОКУЛИУМНІҢ ОҢТАЙЛЫ КОНЦЕНТРАЦИЯСЫН ТАҢДАУ

Мақалада азиялық шегірткенің табиғи популяцияларының кіші жастағы дернәсілдерінде *B. bassiana* саңырауқұлақтарының таңдалған 10 штаммы (таулы және далалық аймақ) үшін доза – өлім тәуелділігін анықтау бойынша жүргізілген тәжірибе нәтижелері көрсетілген. Төрт түрлі конидия титрі бар жұмыс суспензиялары қолданылды (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7). Азиялық шегіртке дернәсілдеріне қатысты барлық сынақ жүргізілген штаммдар 1×10^7 және 5×10^7 жұмыс суспензиясының титрлерінде жоғары ұйыттылықты көрсетті. Қожайын организмнің өлімге ұшырау деңгейі мен жылдамдығы бойынша барлық концентрацияда да ең жақсы әсер етіп, штаммдар ішінде BSc₁-15, BSc₂-15, BTr₁-16, BPit-16, BCa_{3(m)}-09 ерекшелігін көрсетті. Ал ең жоғарғы биологиялық белсенділік BSc₁-15 штаммында 15-ші тәулікте байқалып, тест-бұнақденелілердің өлу деңгейі барлық нұсқаларда 100% құрады. Ең төменгі белсенділікті BHy-09 штаммы 47,5-82,5% аралығында көрсетті. Ал қалған штаммдар орташа деңгейде биологиялық белсенділіктерін көрсетті. Сонымен қатар, бақылау нұсқасындағы (өңдеусіз) азиялық шегіртке дернәсілдерінің 17-тәулікте өлу деңгейі $17,5 \pm 4,78\%$ байқалды. Тәжірибелер нәтижесінде біз салыстырмалы түрде төмен концентрациялардың өзінде (1×10^6 және 5×10^6 конидия/мл) азиялық шегіртке дернәсілдеріне (75-100%) жоғары ұйыттылыққа ие таулы және далалық аймақтан бір-бірден BSc₁-15, BCa_{3(m)}-09 штаммдары таңдалды. Осы эксперименттің мәліметтеріне сүйене отырып, азиялық шегіртке дернәсілдерінің санын бақылауға арналған саңырауқұлақтың жұмыс суспензиясының оңтайлы титрлері 1×10^7 және 5×10^7 құрайды деген тұжырым жасалды, өйткені төмен титрлерді (1×10^6 және 5×10^6) қолданған кезде энтомопатогенді саңырауқұлақ штаммдарының әсері уақыт өте келе созылатындығын көрсетті. Сонымен қатар, белсенділігін жоғары көрсеткен штаммдар келешекте өндіріске ұсынылып, зиянды шегірткелерге қарсы қолданылатын биологиялық препараттардың негізі болады.

Түйін сөздер: саңырауқұлақ, конидия, спора, энтомопатоген, ұйыттылық, *Beauveria bassiana*, штамм, *Locusta migratoria migratoria* L., инокулюм, концентрация.

U.T. Zhumatayeva^{1*}, B.A. Duisembekov²¹South Kazakhstan University named after M. Auezov, Kazakhstan, Shymkent²Kazakh Scientific Research Institute of Plant Protection and Quarantine
named after Zh. Zhiembayev, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: doni_uli@mail.ru

Choosing the optimal concentration of inoculum for effective reduction of the number of asian locust larvae

The article presents the results of experiments to determine the dose-mortality relationships for 10 selected strains of the fungus *B. bassiana* (mountain and steppe) on younger larvae of natural populations of Asian locusts. Working suspensions with four different titers of conidia (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7) were used. All tested strains related to Asian locust larvae showed high toxicity on the titers of working suspensions 1×10^7 and 5×10^7 . According to the mortality rate and the rate of death of the organism, the host had the best effect even at all concentrations, showing the specificity of BSc₁-15, BSc₂-15, BTr₁-16, BPit-16, BCa_{3(m)}-09 among the strains. And the maximum biological activity was observed in the BSc₁-15 strain on the 15th day, and the mortality rate of test insects in all variants was 100%. The lowest activity was shown by the strain BHy-09 in the range of 47.5-82.5%. The remaining strains showed moderate biological activity. At the same time, the mortality rate of Asian locust larvae in the control variant (without treatment) for 17 days was $17.5 \pm 4.78\%$. As a result of the experiments, we selected strains BSc₁-15, BCa_{3(m)}-09 from one of the mountainous and steppe regions, which have high toxicity

(75-100%) to Asian locust larvae at relatively low concentrations (1×10^6 and 5×10^6 conidia/ml), because when using low titers (1×10^6 and 5×10^6), the effect of entomopathogenic fungal strains showed that they stretch over time. Based on the data of this experiment, it was concluded that the optimal titers of the working suspension of the fungus for controlling the number of larvae of Asian locusts are 1×10^7 and 5×10^7 .

Key words: fungi, conidia, spore, entomopathogen, virulence, *Beauveria bassiana*, strain, *Locusta migratoria migratoria* L., inoculum, concentration.

У.Т. Жуматаева^{1*}, Б.А. Дуйсембеков²

¹Южно-Казахстанский университет им. М. Ауэзова, Казахстан, г. Шымкент

²Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений им. Ж. Жиенбаева, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: doni_uli@mail.ru

Выбор оптимальной концентрации инокулюма для эффективного снижения численности личинок азиатской саранчи

В статье представлены результаты экспериментов по определению зависимостей доза – смертность для 10 отобранных штаммов гриба *B. bassiana* (горный и степной) на младших возрастов личинок природных популяций азиатской саранчи. Использовались рабочие суспензии с четырьмя различными титрами конидий (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7). Все испытанные штаммы, относящиеся к личинкам азиатских саранчовых, показали высокую токсичность на титрах рабочих суспензий 1×10^7 и 5×10^7 . По уровню смертности и скорости гибели организма хозяин оказывал наилучший эффект даже при всех концентрациях, проявляя среди штаммов специфичность BSc₁-15, BSc₂-15, BTr₁-16, BPit-16, BCa₃(m)-09. А максимальная биологическая активность наблюдалась у штамма BSc₁-15 на 15-е сутки, а уровень смертности тест-насекомых во всех вариантах составил 100%. Наименьшую активность показал штамм BHy-09 в диапазоне 47,5-82,5%. Остальные штаммы показали умеренную биологическую активность. В то же время уровень смертности личинок азиатских саранчовых в контрольном варианте (без обработки) за 17 суток наблюдался $17,5 \pm 4,78\%$. В результате опытов нами были выбраны штаммы BSc₁-15, BCa₃(m)-09 по одному из горных и степных районов, обладающие высокой токсичностью (75-100%) к личинкам азиатских саранчовых при относительно низких концентрациях (1×10^6 и 5×10^6 конидия/мл), так как при использовании низких титров (1×10^6 и 5×10^6) влияние энтомопатогенных грибковых штаммов показало, что они растягиваются со временем. На основании данных этого эксперимента был сделан вывод, что оптимальные титры рабочей суспензии гриба для контроля количества личинок азиатской саранчи составляют 1×10^7 и 5×10^7 .

Ключевые слова: грибы, конидия, спора, энтомопатоген, вирулентность, *Beauveria bassiana*, штамм, *Locusta migratoria migratoria* L., инокулюм, концентрация.

Қысқартулар мен белгілеулер

Т.д.ж.м – теңіз деңгейінен жоғары метр

B. bassiana – *Beauveria bassiana*

ҚазӨҚЖК ҒЗИ – Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми зерттеу институты

Кіріспе

Қазіргі уақытта Қазақстанда азиялық шегірткенің (*Locusta migratoria migratoria* L.) санын бақылау үшін тек химиялық инсектицидтер қолданылады. Алайда, пестицидтерді кеңінен қолданудың бірқатар маңызды кемшіліктері бар, олардың ішіндегі ең маңыздысы зиянкестердің төзімді популяцияларының пайда болуы және қоршаған ортаның ластануы, осындай күшті қорғаныс құралдарын қолдану бірқатар жағымсыз салдарларды тудырды: топырақтың,

су объектілерінің ластануы, адам мен жануарлардың денсаулығының нашарлауы, пайдалы организмдердің өлімі, сондай-ақ химиялық инсектицидтерге төзімді бунақденелілер популяциясының пайда болуы [1-3]. Бұл жағдайлар табиғат пен адамға зиян тигізбейтін басқа қорғаныс құралдары мен әдістерін іздеу және дамыту қажеттілігін тудырды [4,5]. Бұл жүйенің дамуында микробиологиялық әдіс маңызды рөл атқарады [6,7]. *L. migratoria* L. сан мөлшерін төмендету үшін қоршаған ортаға қауіпсіз биологиялық препараттарды пайдалану өте өзекті мәселе болып табылады. Осыған байланысты өсімдіктерді қорғаудың баламалы экологиялық қауіпсіз әдістерін іздеу қажет. Зиянды фитофагтарды басудың осындай әдістерінің бірі – микробиологиялық қорғау әдісі. Осындай тәсілдерді жасау жолында микробиологиялық әдіс маңызды рөл атқаруда [8,9].

Микробиологиялық препараттар химиялық пестицидтердің орнын ауыстыра алады. Энтмопатогендердің ішінде саңырауқұлақтар биологиялық негіздегі пестицидтер ретінде үлкен назар аудартты [10]. Қазіргі уақытта елімізде энтмопатогенді штамм негізіндегі зиянкестерге әсері жоғары жергілікті бірде-бір препарат жоқтың қасы деуге болады [11].

Энтмопатогендік саңырауқұлақтар жоғары мамандандырылған болуы мүмкін, яғни тек бір иесін, тіпті оның дамуының белгілі бір кезеңінде паразиттік болады. Алайда, саңырауқұлақтардың көпшілігі әртүрлі түрлердің, туыстардың, отрядтардың бунакденелілерінің үлкен шеңберіне әсер ететін кең мамандандырылған паразиттер болып табылады [12].

Сонымен, энтмопатогендік саңырауқұлақтар – бұл биосфера тепе-теңдігін сақтайтын және денсаулықты жақсартатын маңызы бар шаруашылық қызметке қатысатын биологиялық ресурс (улы синтетикалық инсектицидтерді табиғаттан алынған агенттер негізінде биологиялық заттармен алмастырады). «Биологиялық ресурстар» ұғымының қазіргі заманғы түсіндірмесі биоресурстық базаны кеңейту, табиғи және жасанды құрылған биоәуелер ресурстарын басқаруды оңтайландыратын биотехнологияларды дамыту міндеттерін қояды. Сондықтан саңырауқұлақтың биоресурстық потенциалы, оның ішінде табиғи штаммдарды таңдау, саңырауқұлақтың уыттылығын және оның өнімділігін бағалауды зерттеу биологиялық өнімді жасау үшін қажет [13].

Энтмопатогендік препараттар – биологиялық өнімдердің ең көп тараған түрі. Энтмопатогендер әдетте, ауылшаруашылық зиянкестеріне қарсы биологиялық өнімдер үшін негіз болатын табиғи 14 биоценоздың элементтері. Энтмопатогендердің табиғатына байланысты бактериялық, вирустық, саңырауқұлақ және басқа препараттар деп бөлінеді. Биологиялық препараттардың маңызды артықшылығы – оларды пайдалану табиғи биоауантүрлілікті сақтауға ықпал етеді, бұл зиянды объектілердің санын реттеуге табиғи агенттердің қатысуын қамтамасыз етеді және биоценоздардың табиғи өзін-өзі реттелуін қалпына келтіреді [14-16].

Әлемде саңырауқұлақтардың 12 түрлеріне негізделген 150-ден астам энтмопатогендік саңырауқұлақ препараттары жасалды [17-19]. Саңырауқұлақтардың жекелеген түрлерін алу технологиясы олардың сипаттамаларына байланысты.

Бүгінгі таңда біздің елімізде, ТМД аумағында және басқа елдерде *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill., *Verticillium lecanii* Zimm. және *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. энтмопатогенді саңырауқұлақ штаммдарын зерттеу бойынша белсенді жұмыстар жалғасуда [20-31].

Биологиялық өнімді қолдану технологиясын жасау кезінде патогеннің оңтайлы дозаларын анықтау маңызды элемент болып табылады. Осыған байланысты зиянкестер өлімінің қолданылған изолятқа да, конидия титріне де тәуелділігін анықтау мақсатында *B. bassiana* он табиғи изоляттары азиялық шегірткенің дернәсілдеріне сыналды (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7).

Зерттеу материалдары мен әдістері

Тәжірибелерде 2009-2016 жылдары Ж. Жиембаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институтының биотехнология зертханасының қызметкерлері Қазақстан мен Қырғызстанның әртүрлі табиғи-климаттық аймақтарында жинаған патологиялық материалдан бөлінген *B. bassiana* туысына жататын энтмопатогенді саңырауқұлағының таңдап алынған 10 штаммдары іріктеліп пайдаланылды. Стандарт ретінде Ресей ауылшаруашылық ғылымдары академиясының Бүкілресейлік өсімдік қорғау ғылыми-зерттеу институтының (С. Петербург) коллекциясынан ББК-1 штаммы (*B. bassiana*) қолданылды (кесте-1).

B. bassiana саңырауқұлақ таңдап алынған 10 штаммдарын сынау үшін Алматы облысының Балқаш ауданы, Бақанас ауданынан азиялық шегірткелерінің 2-3 жастағы дернәсілдері жиналды.

Моноспоралық изоляттар жалпы қабылданған әдістеме бойынша алынды [32]. Азиялық шегірткеге қатысты таңдап алынған 10 штаммдардың биологиялық белсенділігін бағалау үшін суспензиялар дайындалды. Залалдау титрін 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 конидий/мл деңгейінде мөлшерлеу В.М. Гораль әдістемесі бойынша жүзеге асырылды [4]. Спора титрі Горьев камерасының көмегімен анықталды [33].

Залалдау дернәсілдерді суспензияға батыру арқылы жүзеге асырылды. Бақылауға алынған дернәсілдер дистилденген сумен өңделді. Егер бір уақытта инокулюмның бірнеше концентрациясы бағаланса, алдымен титрі төмен нұсқалар өңделеді. Қайталама 4-реттік.

1-кесте – Азиялық шегірткенің сан мөлшерін тиімді төмендету үшін инокулюмнің оңтайлы концентрациясын таңдау бойынша эксперименттерде пайдаланылған *B. bassiana* штаммдары

№	Штаммның атауы	Бөліп алынған объектісі	Бөліп алынған орны, жылы
	1	2	3
1	BCo ₁ -14	<i>Coleoptera</i>	Қостанай, орманды далалы ландшафты, Тобыл өзені, 2014 ж, 22 маусым
2	BSc ₁ -15	<i>Scolytidae (Ips hauseri)</i>	Медеу Іле-Алатауы 1200-1500 т.д.ж.м биіктігінен, 2015 ж
3	BSc ₂ -15	<i>Scolytidae (Ips hauseri)</i>	Медеу Іле-Алатауы 1200-1500 т.д.ж.м биіктігінен, 2015 ж
4	BTr ₁ -16	<i>Trypodendron cirratum</i>	Қырғызстан республикасы, 2016 ж, маусым
5	BPit-16	<i>Pityogenes spessivtsev</i>	Қырғызстан республикасы, 2016 ж, маусым
6	BCa _{2(m)} -09	<i>Carabidae</i>	ОҚО, Мақтарал ауданы, Есентаев ауылы, 2009 ж, 30 маусым
7	BCa _{3(m)} -09	<i>Carabidae</i>	ОҚО, Мақтарал ауданы, Есентаев ауылы, 2009 ж, 30 маусым
8	BCo _{2(к)} -09	<i>Coleoptera</i>	Жамбыл облысы, Қордай ауданы, 2009 ж, маусым
9	BScar-09	<i>Scarabidae</i>	Жамбыл облысы, Қордай ауданы, 2009 ж, шілде
10	BHy-09	<i>Hymenoptera</i>	Жамбыл облысы, Қордай ауданы, 2009 ж, шілде
11	ББК-1	<i>Calliptamus italicus</i>	Ресей, Жаңасібір облысы, Карасу ауданы, 2000 ж.

Тәжірибелік мәліметтерді математикалық өңдеу вариация статистикасының жалпы қабылданған әдістерін қолдану арқылы жүзеге асырылды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Биопрепараттарды қолдану технологиясын өңдеу барысында патогеннің суспензиясының оптималды титрін анықтау маңызды элементтердің бірі болып табылады[34].

Осыған байланысты біз азиялық шегірткенің табиғи популяцияларының кіші жастағы дернәсілдерінде *B. bassiana* саңырауқұлақтарының таңдалған 10 штаммы (таулы және далалық аймақ) үшін доза – өлім тәуелділігін анықтау бойынша тәжірибе жүргіздік.

Сонымен қатар, энтомопатогенді саңырауқұлақ үшін «доза-өлім» тәуелділігі әдетте регрессияның төмен көлбеу мәніне ие. Бұл құбылыстың мәні тиімділікті пропорционалды түрде арттыру үшін споралар санының едәуір артуы қажет [35]. Төрт түрлі конидий титрі бар жұмыс суспензиялары қолданылды (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7). Жүргізілген бақылаулар көрсеткендей, эксперименттің барлық нұсқаларында дернәсілдердің өлімі бақылаумен салыстырғанда жоғары болған. Сонымен қатар, инокулюм концентрациясына байланысты өлімнің соңғы деңгейі мен өлім жылдамдығында айтарлықтай айырмашылықтар байқалды [16].

Сонымен, залалданғаннан кейінгі 11-ші тәулікте BSc₁-15, ал 13-ші тәулікте BTr₁-16, BSc₂-15, 17-ші тәулікте BCa_{3(m)}-09 штаммдары үшін 1×10^7 және 5×10^7 концентрациясы кезінде өлім деңгейі сәйкесінше 100%, ал 13-ші тәулікте BPit-16 жоғары екі концентрациясы кезінде 70-100% құрады содан кейін минималды титр (1×10^6) кезінде бұл көрсеткіштің мәні 40-67,5%-дан аспады (кесте-2). Дернәсілдерді ББК-1 штаммымен залалдаған кезде 9-шы тәулікте 1×10^6 титрі бар саңырауқұлақтардан бунақденелілердің өлімі 70% болды, ал 5×10^7 концентрациясы 100% жетті.

BSc₁-15 штаммымен залалдағаннан кейінгі 15-ші тәуліктің өзінде барлық концентрация нұсқаларында дарақтар 100% өлді. Мұнда дернәсілдердің микозға сезімталдығының саңырауқұлақтың жұмыс суспензиясының титріне тәуелділігі анықталған [31]. Сонымен, егер дернәсілдерді 1×10^7 және 5×10^7 , 5×10^6 титрлерімен BSc₁-15 штаммымен залалдаған кезде, инокуляциядан кейін 9-шы күні өлім деңгейі сәйкесінше 87,5 және 97,5%-ға жетсе, ал концентрацияның 1×10^6 дейін төмендеуімен бұл көрсеткіштің мәні 40%-дан аспады. Әрі қарай, бұл айырмашылықтар теңестірілді және 15-ші күні барлық өңделген дарақтар суспензия титрына қарамастан өлді. Бұл штаммның иесінің өлу жылдамдығы бойынша ең жақсысы болып шықты және ББК-1 (эталон) штаммынан айтарлықтай ерекшеленбеді.

2-кесте – Жұмыс суспензиясының әр түрлі титрлерінде *L. migratoria* L. 2-3 жастағы дернәсілдеріндегі *B. bassiana* саңырауқұлақтары штаммдарының биологиялық белсенділігінің динамикасы (Алматы қаласы, ҚазОҚЖК ҒЗИ биотехнология зертханасы, 2019 ж.)

Штамм	Титр	Өлу жағдайы %, залалданғаннан кейінгі тәулік							
		3	5	7	9	11	13	15	17
Таулы аймақ									
BCo1-14	1x10 ⁶	5,0±5,0	5,0±5,0	5,0±5,0	7,5±4,7	12,4±3,2	27,5±2,5	30,0±4,08	35,0±4,03
	5x10 ⁶	15,0±2,8	20,0±4,08	22,5±2,5	22,5±2,5	22,5±8,5	30,0±9,1	35,0±6,4	40,0±7,07
	1x10 ⁷	20,0±7,07	27,5±7,5	27,5±7,5	37,5 ±6,2	45,0±5,0	50,0±8,1	55,0 ±2,4	60,0 ±9,1
	5x10 ⁷	35,0±2,88	50,0±4,08	52,5±2,5	70,0 ±4,08	80,0±7,0	85,0±5,0	90,0 ±5,7	95,2±10,3
BSc1-15	1x10 ⁶	15,0±28	17,5±2,5	25,0±6,4	40,0 ±8,1	60,0±9,1	87,5±4,7	100	100
	5x10 ⁶	15,0 ±2,8	25,0±8,6	50,0±9,1	92,5±4,7	90,0±5,7	100	100	100
	1x10 ⁷	22,5 ±8,5	32,5±8,5	52,5±11,0	87,5±7,5	100	100	100	100
	5x10 ⁷	27,5±10,3	52,5±19,7	90,0±10,0	97,5±2,5	100	100	100	100
BSc2-15	1x10 ⁶	12,5±4,7	17,5±4,7	17,5±4,7	20,0±5,7	30,0 ±7,07	40,0±7,07	52,5±7,5	60,0±4,8
	5x10 ⁶	22,5±2,5	30,0±7,07	35,0±6,4	50,0±10	72,5±9,4	95,0±5,0	100	100
	1x10 ⁷	20,0±7,07	32,5±9,4	45,0±11,9	65,0±12	95,0±5,0	100	100	100
	5x10 ⁷	25,0±9,5	35,0±14,4	50,0±12,2	80,0±10,8	97,5±2,5	100	100	100
BTr1-16	1x10 ⁶	22,5±6,2	27,5±4,7	30,0±6,1	45,0±9,5	62,5±6,3	67,5±4,7	77,5±6,2	90,0±5,72
	5x10 ⁶	25,0±2,8	30,0±8,1	45,0±6,4	92,5±4,7	97,5±2,5	100	100	100
	1x10 ⁷	40,0±4,08	57,5±13,7	92,5±4,7	97,5±2,5	97,5±2,5	100	100	100
	5x10 ⁷	45,0±5,0	57,5±6,2	80,0±5,7	92,5±7,5	100	100	100	100
BPit-16	1x10 ⁶	22,5±8,5	37,5±2,5	42,5±4,7	42,5±4,7	45,0±6,4	50,0±7,07	55,0±6,4	75,0±6,45
	5x10 ⁶	22,5±13,1	22,5 ±8,5	27,5±8,5	30,0±9,1	37,5±11,1	45,2±5,2	50,0±7,07	52,5±4,78
	1x10 ⁷	27,5±4,7	25,0±13,2	35,0±12,5	55,0 ±8,6	67,5±4,7	70,0±7,07	77,5±6,21	80,0±6,31
	5x10 ⁷	40,0±9,1	46,0±14,0	55,5±11,2	95,0±2,8	97,5±2,5	100	100	100
Далалы аймақ									
BCO ₂ -09	1x10 ⁶	15,0±6,4	25,0±2,8	25,0±8	32,5±6,2	35,0±5,0	37,5±4,7	47,5±8,5	52,5±8,5
	5x10 ⁶	10,0±4,0	12,5±2,5	17,5±4,7	25,0±9,5	32,5±6,2	37,5±6,2	47,5±6,2	52,5±8,5
	1x10 ⁷	15,0±2,8	20,0±4,0	30,0±4,0	50,0±4,0	57,5±6,2	62,5±2,5	72,5±7,0	72,5±7,5
	5x10 ⁷	25,0±10,4	47,5±10,3	62,5±11,0	72,5±8,5	85,0±2,8	85,0±2,8	87,5±4,7	87,5±4,7
BHy-09	1x10 ⁶	22,5±8,5	25,0±10,4	30,0±7,0	32,5±9,4	35,0±9,5	37,5±8,5	45,0±6,4	47,5±4,7
	5x10 ⁶	32,5±11,8	37,5±7,5	40,0±9,1	47,5±7,5	52,5±11,0	60,0±10,8	70,0±4,0	72,5±4,7
	1x10 ⁷	12,5±7,5	22,5±7,5	35,0±2,8	47,5±11,0	62,5±8,5	67,5±4,7	77,5±8,5	87,5±4,7
	5x10 ⁷	25,0±10,4	32,5±6,2	32,5±6,2	32,5±6,2	45,0±8,6	57,5±4,7	65,0±5,0	82,5±7,5

Штамм	Титр	Өлу жағдайы %, залалданғаннан кейінгі тәулік							
		3	5	7	9	11	13	15	17
BScar-09	1x10 ⁶	2,5±5,7	12,5±4,7	17,5±2,5	25,0±8,6	32,5±7,5	40,0±10,8	55,0±6,4	55,0±6,4
	5x10 ⁶	5,0±2,5	20,0±9,1	22,5±8,5	37,5±16,5	50,0±10,8	57,5±14,3	65,0±13,2	67,5±14,9
	1x10 ⁷	10,0±5,0	10,0±4,0	22,5±6,2	32,5±7,5	47,5±4,7	60,0±8,1	70,0±9,1	75,0±8,6
	5x10 ⁷	7,5±4,7	27,5±11,8	35,0±11,9	57,5±17,5	65,0±17,5	75,0±15,5	80,0±14,1	90,0±5,7
BCa2(m)-09	1x10 ⁶	5,0±2,8	10,0±4,0	17,5±4,7	20,0±4,0	22,5±2,5	22,5±2,5	40,0±10,8	57,5±17,0
	5x10 ⁶	12,5±12,5	42,5±7,5	47,5±10,3	57,5±7,5	65,0±8,6	75,0±6,4	80,0±9,1	82,5±8,5
	1x10 ⁷	10,0±7,0	17,5±8,5	22,5±6,2	37,5±6,2	45,0±2,8	55,0±6,4	62,5±4,7	80,0±4,0
	5x10 ⁷	30,0±4,0	35,0±6,4	45,0±8,6	52,5±11,0	75,5±7,5	77,5±4,7	82,5±4,7	90,0±7,0
BCa3(m)-09	1x10 ⁶	7,5±4,7	15,0±5,0	20,0±7,0	27,5±2,5	30,0±4,0	42,5±4,7	57,5±4,7	75,0±7,0
	5x10 ⁶	12,5±2,2	27,5±2,8	32,5±3,6	50,0±4,9	50,0±5,19	60,0±5,9	65,0±6,6	87,5±7,4
	1x10 ⁷	7,5±7,5	20,0±4,0	33,5±4,7	39,0±8,1	47,5±7,5	52,5±4,7	75,0±11,9	100
	5x10 ⁷	22,5±8,5	40,0±9,1	50,0±4,08	60,0±7,0	70,0±7,0	82,5±2,5	85,5±2,5	100
ББК-1 (эталон)	1x10 ⁶	5,0±5,0	8,0±5,8	50,0±12,9	70,0±8,2	88,0±5,0	88,0±5,0	88,0±5,0	90,0±5,8
	5x10 ⁶	0,0	0,0	52,0±9,6	83,0±8,2	95,0±5,0	95,0±5,0	95,0±5,0	100
	1x10 ⁷	5,0±5,0	19,0±9,6	55,0±9,6	97,0±5,0	100	100	100	100
	5x10 ⁷	0,0	5,0±5,0	75,0±5,8	100	100	100	100	100
Бақылау		0,0	0,0	0,0	1,1±2,1	2,0±2,8	3,8±2,5	5,0±2,8	17,5±4,78
HCP ₀₅		18,2	22,2	22,4	24,1	23,4	23,8	23,8	24,4

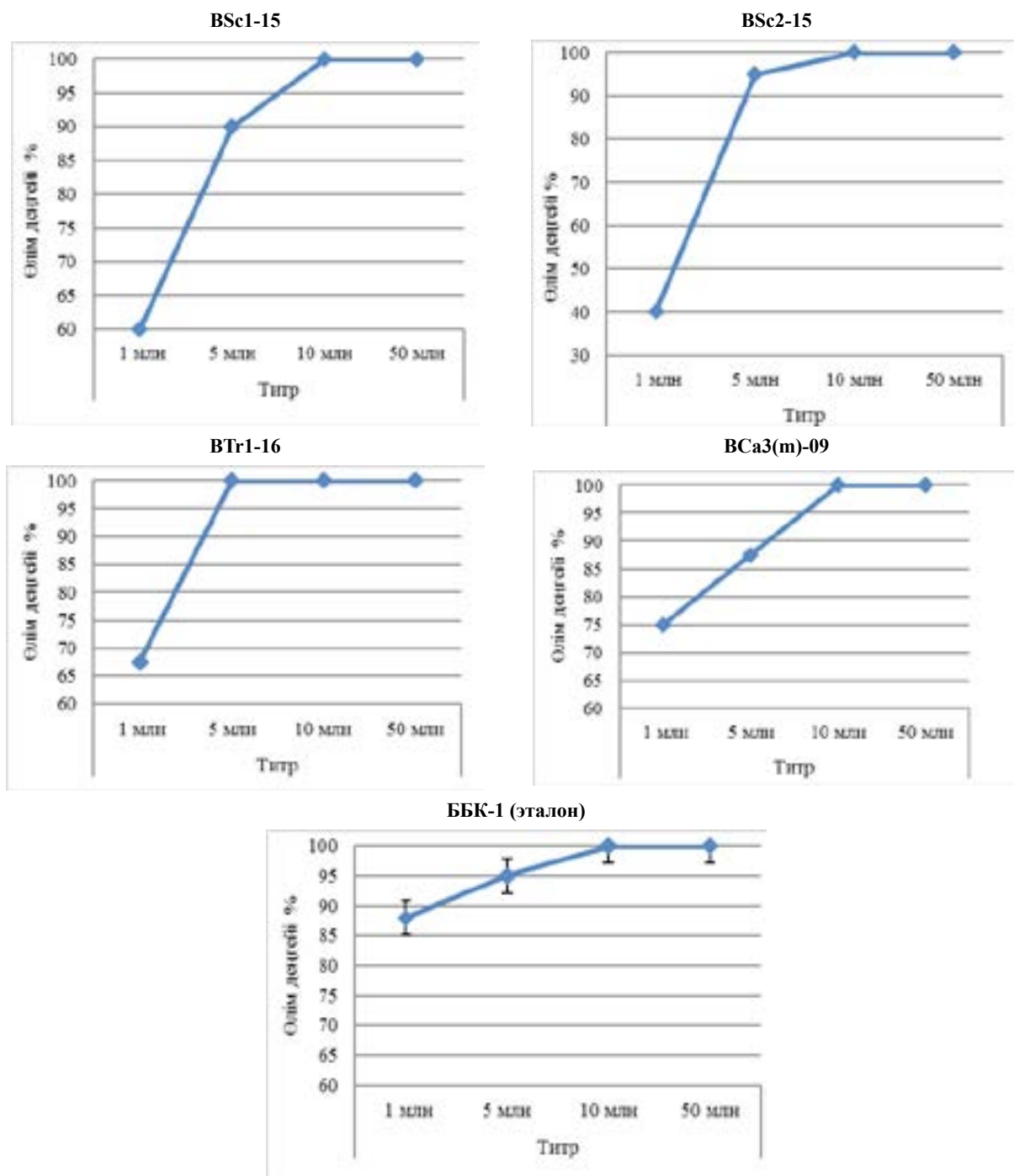
Титрдің 5x10⁶-ға дейін төмендеуінде тек үш штамм (BSc1-15, BSc2-15, BTr1-16) инокуляциядан кейінгі 15-ші тәулікте тест-иесінің 100% өлімін көрсетті. Осы изоляттар үшін өлім динамикасында жоғарыда аталған үш титрдің арасында айтарлықтай айырмашылықтар табылған жоқ.

Барлық сынақ штаммдары төмен концентрацияда жоғары уыттылықты көрсеткен жоқ: 1x10⁶ концентрациясында өлім 100% деңгейінде тек BSc1-15 (өндеуден кейін 15-ші тәулік) штаммында ғана байқалды.

Сонымен бірге бақылау кезінде бүкіл бақылау нұсқаларындағы өлім деңгейі 17,5%-дан аспады.

Жұмыс суспензиясының титріне байланысты кіші жастағы азиялық шегірткелеріне қатысты *B. bassiana* саңырауқұлағы штаммдарының 1x10⁷ және 5x10⁷ концентрацияларында 100% белсенділік көрсеткен штаммдар болды (BSc1-15 11-ші тәулік, BSc₂-15 13-ші тәулік, BTr₁-16 13-ші тәулік BCa_{3(m)}-09 17-ші тәулік, ББК-1 (эталон) 11-ші тәулік) (1-сурет). BSc1-15 штаммы 11-ші тәулікте (1x10⁷ және 5x10⁷) 100% белсенділік көрсетті.

Осы эксперименттің мәліметтеріне сүйене отырып, азиялық шегіртке дернәсілдерінің санын бақылауға арналған саңырауқұлақтың жұмыс суспензиясының оңтайлы титрлері 1x10⁷ және 5x10⁷ құрайды деген қорытынды жасауға болады.



1-сурет – Жұмыс суспензиясының титріне байланысты кіші жастағы азиялық шегірткелеріне қатысты *B. bassiana* саңырауқұлағы штаммдарының (BSc1-15, BSc2-15, BTr1-16, BCa3(m)-09, ББК-1 (эталон)) биологиялық белсенділігі

Сонымен, қожайын организмнің өлімге ұшырау деңгейі мен жылдамдығы бойынша барлық концентрацияда да ең жақсы әсер етіп, штаммдар ішінде BSc₁-15, BSc₂-15, BTr₁-16, BPit-16, BCa_{3(m)}-09 ерекшелігін көрсетті. Ал ең жоғарғы биологиялық белсенділік BSc1-15 штаммында

15-ші тәулікте байқалып, тест-бунақденелілердің өлу деңгейі барлық нұсқаларда 100% құрады. Ең төменгі белсенділікті ВНу-09 штаммы 47,5-82,5% аралығында көрсетті. Ал қалған штаммдар орташа деңгейде биологиялық белсенділіктерін көрсетті. Сонымен қатар, бақылау нұсқасындағы

(өңдеусіз) азиялық шегіртке дернәсілдерінің 17-тәулікте өлу деңгейі $17,5 \pm 4,78\%$ байқалды.

Қорытынды

Қорытындылай келе, азиялық шегіртке дернәсілдеріне қатысты барлық сынақ жүргізілген штаммдар 1×10^7 және 5×10^7 жұмыс суспензиясының титрлерінде жоғары уыттылықты көрсеткенін атап өткен жөн. Эксперимент нәтижесі азиялық шегірткелерге арналған тәжірибелерде жұмыс суспензияларын жоғары титрлі споралармен алу тиімді (1×10^7

және 5×10^7), өйткені төмен титрлерді (1×10^6 және 5×10^6) қолданған кезде энтомопатогенді саңырауқұлақ штаммдарының әсері уақыт өте келе созылатындығын көрсетті. Осылайша, тәжірибелер нәтижесінде біз салыстырмалы түрде төмен концентрациялардың өзінде (1×10^6 және 5×10^6 конидия/мл) азиялық шегіртке дернәсілдеріне (75-100%) жоғары уыттылыққа ие таулы және далалық аймақтан бір-бірден BSc₁-15, BCa_{3(m)}-09 штаммдарын таңдап алдық. Алдағы уақытта осы екі түрлі аймақ штаммдарымен салыстырмалы түрде жұмыстар жасалатын болады.

Әдебиеттер

- 1 Искаков Н.С., Красникова В.М. Овощные вредители. – Алматы: Бастау, 1991. – 247 с.
- 2 Сикура А.И., Сикура Л.В. Энтомопатогены – грибы, бактерии, простейшие, нематоды. – М.: Наука, 1981. – 188 с.
- 3 Цибульска А.И. Применение рижского штамма гриба белой мускардины в борьбе с колорадским жуком. // Патология насекомых и клещей. – Рига, 1972. – 155 с.
- 4 Гораль В.М., Лаппа Н.В. Влияние боверина в разных концентрациях на личинок колорадского жука. / Сб. Защита растений. – Киев, 1973, вып. 18. – 57 с.
- 5 Леднев Г.Р., Борисов Б.А., Митина Г.В. Возбудители микозов насекомых: Пособие по диагностике. – СПб., 2003. – 79 с.
- 6 Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение. – Л.: Наука, 1974. – 260 с.
- 7 Вейзер Я. Микробиологический метод борьбы с вредными насекомыми. – М.: Колос, 1972. – 639 с.
- 8 Слямова Н.Д., Смагулова Ш.Б., Абдукадырова А.Д., Болатбекова Б.К., Успанов А.М. Экологические безопасные методы контроля численности колорадского жука с использованием энтомопатогенных грибов в условиях Юго-Востока Казахстана // Изденістер, нәтижелер – Исследования, результаты. – Алматы, № 4 (76) 2017. – С. 436-442.
- 9 Смагулова Ш.Б., Дуйсембеков Б.А., Слямова Н.Д., Успанов А.М., Леднев Г.Р., Левченко М.В., Энтомопатогенные анаморфные аскомицеты в популяциях жуков-короедов в Юго-Восточном Казахстане и оценка их специфичности // Изденістер, нәтижелер – Исследования, результаты. – №4 (76) 2017. – С. 449-457.
- 10 Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types // Biol Control (2007) 43:237–256 p.
- 11 Абдукерим Р.Ж., Туленгутова К.Н., Хидиров К.Р., Жунусова А.С., Алимкулова М.К. Биологическая активность энтомопатогенных грибов выделенных из короеда на насекомых из других систематических групп // Изденістер, нәтижелер – Исследования, результаты. – Алматы, № 4 (76) 2017. – 222-228 б.
- 12 Burge M. N. The scope of fungi in biological control. // Fungi in biological control systems. Manchester – New York: Manchester University Press, 1988. – p. 1-18.
- 13 Смагулова Ш.Б., Успанов А.М., Слямова Н.Д., Дуйсембеков Б.А. Зависимость смертности личинок колорадского жука от концентрации инокулюма штаммов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* // Биологические науки Казахстана. – № 2, 2010. – С. 69-74.
- 14 Новикова И.И. Микробиологические препараты в защите растений от вредителей и болезней // Интегрированная защита растений: стратегия и тактика. – Минск-Несвиж, 2011. – С. 312-316.
- 15 Коломиец Э.И. Вклад микробиологической науки в развитие агротехнологий в Республике Беларусь // Наука и инновации. – 2016. – № 6. – С. 23-25. – 202 с.
- 16 Коломиец Э.И. Биологические средства защиты растений как основа оздоровления и стабилизации агробиоценозов // Материалы XII Генеральной Ассамблеи ВПРС МОББ и Международной научной конференции «Биологическая защита растений: успехи, проблемы, перспективы». Информационный бюллетень ВПРС МОББ. – СПб., 2017. – 52. – С. 172-179.
- 17 The Manual of Biocontrol Agents. – ВСПС. – 2004. – 702 p.
- 18 Штерншиш М.В. Энтомопатогены – основа биопрепаратов для контроля численности фитофагов. – Новосибирск: НГАУ, 2010. – 157 с.
- 19 Tabakovic-Tosic M.V., Golubovicurgus, D. Totic New technological methods in the integrated forest protection in the Republic of Serbia // Integrated plant protection: strategy and tactics. – Nesvizh. – 2011. – P. 49-55.
- 20 Серебров В.В., Глушак О.А., Лемяк А.И., Алексеев А.А., Степанова Е.В. Влияние энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* на ферментативную активность в органах и тканях гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus superanssibiricus* Tsch. (Lepidoptera, Lasiocampidae) // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2004. – вып. 3. – С. 51-52.

- 21 Мальярчук А.А., Цветкова В.П., Штерншис М.В. Оптимизация использования энтомопатогенного гриба *Metarhizium anisopliae* против колорадского жука // Биологическая защита растений основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2008. – вып. 5. – С. 224-225.
- 22 Янковская У.Н., Прищепа Л.И., Угначёва Е.В. Биологическая активность энтомопатогенного гриба *Lecanicillium lecanii* по отношению к фитофагам тепличных культур // Интегрированная защита растений: стратегия и тактика. – Минск – Несвиж, 2011. – С. 386-387.
- 23 Каменова А.С., Леднев Г.Р., Левченко М.В., Баймагамбетов Е.Ж., Макаров Е.М. Оценка биологической активности штаммов гриба *Beauveria bassiana* в полевых условиях // Инновационные экологически безопасные технологии защиты растений. Материалы Международной научной конференции (24-25 сентября 2015 г.). – Алматы, 2015. – С. 604-609.
- 24 Леднёв Г.Р., Павлюшин В.А., Левченко М.В., Успанов А.М. Современные представления о разработке биологических препаратов на основе энтомопатогенных анаморфных аскомицетов для снижения численности вредных членистоногих // Инновационные экологически безопасные технологии защиты растений. Материалы Международной научной конференции (24-25 сентября 2015 г.). – Алматы, 2015. – С. 622-626.
- 25 Смагулова Ш.Б., Макаров Е.М., Баймагамбетов Е.Ж., Абдукадырова А.Д., Болатбекова Б.Х. Определение эффективности штаммов энтомопатогенного гриба рода *Beauveria* в подавлении численности личинок колорадского жука // Инновационные экологически безопасные технологии защиты растений. Материалы Международной научной конференции (24-25 сентября 2015 г.). – Алматы, 2015. – С. 640-643.
- 26 Tserodze M., Meskhi N. Biological control of winter moth // Innovative and ecologically safe technologies in plant protection. – Almaty, 2015. – P. 246-248.
- 27 Войтка Д.В., Янковская Е.Н., Юзефович Е.К., Герасимович М.С. Коллекционный фонд микроорганизмов как научная основа биотехнологических разработок для защиты растений // Состояние и перспективы защиты растений. Материалы 232 Международной научно-практической конференции. – Минск, 2016. – С. 51-54.
- 28 Малюга А.А. Влияние новых биопрепаратов на оздоровление картофеля от колорадского жука и продуктивность культуры в лесостепи Западной Сибири / А.А. Малюга, Н.С. Чуликова // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2016. – вып.9. – С. 385-388.
- 29 Прищепа Л.И., Герасимович М.С. Биологическая активность энтомопатогенных грибов, выделенных в лесных биотопах Республики Беларусь // Состояние и перспективы защиты растений: Материалы Международной научно-практической конференции. – Минск, 2016. – С.107-109.
- 30 Цветкова В.П., Шпатова Т.В., Лесяк А.А., Штерншис М.В. Влияние энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* на болезни картофеля и ягодных культур // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2016. – вып. 9. – С. 311-313.
- 31 Янковская Е.Н., Войтка Д.В. Биологический контроль фитофагов тепличных культур препаратом на основе энтомопатогенного гриба *Lecanicillium lecanii* Gams & Zare // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – Краснодар, 2016. – вып.9. – С. 330-332.
- 32 Нетрусова Н. Практикум по микробиологии: учеб. пособие / Под ред. Нетрусова. – М.: Изд. центр «Академия», 2005. – 608 с.
- 33 Егорова Н.С. Промышленная микробиология: учеб. пос. для вузов / Под ред. Егорова Н.С. – М.: Высш. Шк., 1989. – 688 с.
- 34 Zhumatayeva U.T., Duisembekov B.A., Begaliev A.M., Sabdenova U.O., Yerkekulova K.K., Screening of collection strains (collections) of entomopathogenic fungi against asian locusts for signs of virulence // Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты. №1 (89) 2021. – С. 225-235.
- 35 Jaronski S. T. S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal Entomopathogens // BioControl (2010) 55:159–185 DOI 10.1007/s10526-009-9248-3 Received: 1 September 2009 / Accepted: 19 October 2009 / Published online: 24 November 2009, US Government 2009.

References

- 1 Abdukerim R.ZH., Tulengutova K.N., Khidirov K.R., Zhunusova A.S., Alimkulova M.K. (2017) Biologicheskaya aktivnost' entomopatogennykh gribov vydelennykh iz koroyeda na nasekomykh iz drugikh sistematicheskikh grupp [Biological activity of entomopathogenic fungi isolated from bark beetles on insects from other systematic groups]. Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты. Almaty, № 4 (76). pp. 222-228.
- 2 Burge M. N. (1988) The scope of fungi in biological control. Fungi in biological control systems. Man-chester – New York: Manchester University Press, pp. 1–18.
- 3 Evlakhova A.A. (1974) Entomopatogennyye griby [Entomopathogenic fungi]. Sistematika, biologiya, praktich-eskoye znachenіye. – L.: Nauka, 1974. – pp. 260.
- 4 Faria M.R., Wraight S.P. (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types // Biol Control 43, pp. 237–256.
- 5 Goral' V.M., Lappa N.V. (1973) Vliyaniye boverina v raznykh kontsentratsiyakh na lichinok koloradskogo zhuka [Effect of boverin in different concentrations on the larvae of the Colorado potato beetle]. Sb. Zashchita rasteniy, Kiyev. vyp. pp.18-57.
- 6 Isakov N.S., Krasnikova V.M. (1991). Ovoshchnyye vrediteli [Vegetable pests]. – Almaty: Bastau, - pp.247.
- 7 Jaronski S.T. (2009) Ecological factors in the inundative use of fungal Entomopathogens // BioControl (2010) 55:159–185 DOI 10.1007/s10526-009-9248-3 Received: 1 September 2009 / Accepted: 19 October 2009 / Published online: 24 November 2009, US Government.

- 8 Kamenova A.S., Lednev G.R., Levchenko M.V., Baymagambetov Ye.ZH., Makarov Ye.M. (2015) Otsenka bio-logicheskoy aktivnosti shtammov griba *Beauveria bassiana* v polevykh usloviyakh [Assessment of the biological activity of *Beauveria bassiana* strains in the field] *Innovatsionnyye ekologicheski bezopasnyye tekhnologii zashchity rasteniy. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii* (24-25 sentyabrya 2015g.). – Almaty, – pp.604-609.
- 9 Kolomiyets E.I. (2016) Vklad mikrobiologicheskoy nauki v razvitiye agrotekhnologiy v Respublike Belarus' [The contribution of microbiological science to the development of agricultural technologies in the Republic of Belarus] *Nauka i innovatsii*. – №6. – pp.23-25. 202.
- 10 Kolomiyets E.I. (2017) Biologicheskiye sredstva zashchity rasteniy kak osnova ozdorovleniya i stabilizatsii agrobiotsenozov [Biological plant protection products as the basis for the improvement and stabilization of agrobiocenoses] *Materialy XII General'noy Assamblei VPRS MOBB i Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Biologicheskaya zashchita rasteniy: uspekhi, problemy, perspektivy»*. *Informatsionnyy byulleten' VPRS MOBB*. – Spb., 52, – pp.172-179.
- 11 Lednev G.R., Pavlyushin V.A., Levchenko M.V., Uspanov A.M. (2015) Sovremennyye predstavleniya o raz-rabotke biologicheskikh preparatov na osnove entomopatogennykh anamorfnikh askomitsetov dlya snizheniya chislennosti vrednykh chlenistonogikh [Modern ideas about the development of biological preparations based on entomopathogenic anamorphic ascomycetes to reduce the number of harmful arthropods]. *Innovatsionnyye ekologicheski bezopasnyye tekhnologii zashchity rasteniy. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii* (24-25 sentyabrya). – Almaty, – pp.622-626.
- 12 Lednev G.R., Borisov B.A., Mitina G.V. (2003) Vozbuditeli mikozy nasekomykh [Pathogens of mycoses of insects]. *Posobiye po diagnostike*. – S-Pb., – pp. 79.
- 13 Malyarchuk A.A., Tsvetkova V.P., Shternshis M.V. (2008) Optimizatsiya ispol'zovaniya entomopatogennogo griba *Metarhizium anisopliae* protiv koloradskogo zhuka [Optimization of the use of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against the Colorado potato beetle] *Biologicheskaya zashchita rasteniy osnova stabilizatsii agroekosistem*. – Krasnodar, – vyp.5. – pp.224-225.
- 14 Malyuga A.A. (2016) Vliyaniye novykh biopreparatov na ozdorovleniye kartofelya ot koloradskogo zhuka i produktivnost' kul'tury v lesostepi Zapadnoy Sibiri [Influence of new biological products on the improvement of potatoes from the Colorado potato beetle and crop productivity in the forest-steppe of Western Siberia]. *Biologicheskaya zashchita rasteniy – osnova stabilizatsii agroekosistem*. – Krasnodar, – vyp.9. – pp.385-388.
- 15 Netrusova N. (2005) Praktikum po mikrobiologii [Workshop on microbiology]: Ucheb. posobiye Pod red. Netrusova. – M.: Izd. tsentr «Akademiya». – pp. 608.
- 16 Novikova I.I. (2011) Mikrobiologicheskiye preparaty v zashchite rasteniy ot vrediteley i bolezney [Microbiological preparations in plant protection against pests and diseases] *Integrirovannaya zashchita rasteniy: strate-giya i taktika*. – Minsk – Nesvizh, – pp.312-316
- 17 Prischepa L.I., Gerasimovich M.S. (2016) Biologicheskaya aktivnost' entomopatogennykh gribov, vydelennykh v lesnykh biotopakh Respubliki Belarus' [Biological activity of entomopathogenic fungi isolated in forest biotopes of the Republic of Belarus]. *Sostoyaniye i perspektivy zashchity rasteniy. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. – Minsk, – pp.107-109.
- 18 Serebrov V.V., Glushak O.A., Lelyak A.I., Alekseyev A.A., Stepanova Ye.V. (2004) Vliyaniye entomopatogen-nogo griba *Metarhizium anisopliae* na fermentativnuyu aktivnost' v organakh i tkanyakh gusenits sibirskogo shelkopryada *Dendrolimus superanssibiricus* Tsch. (Lepidoptera, Lasiocampidae) [Influence of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on enzymatic activity in organs and tissues of Siberian silkworm caterpillars *Dendrolimus superanssibiricus* Tsch. (Lepidoptera, Lasiocampidae)] *Biologicheskaya zashchita rasteniy – osnova stabilizatsii agroekosistem*. – Krasnodar, – vyp.3. – pp.51-52.
- 19 Sikura A.I., Sikura L.V. (1981) Entomopatogeny – griby, bakterii, prosteyshiye, nematody [Entomopathogens – fungi, bacteria, protozoa, nematodes]. – M., Nauka, – pp. 188.
- 20 Slyamova N. D., Smagulova Sh. B., Abdukadyrova A.D., Bolatbekova B. K., Uspanov A.M. (2017) Ekologicheskiye bezopasnyye metody kontrolya chislennosti koloradskogo zhuka s ispol'zovaniyem entomopatogennykh gribov v usloviyakh Yugo-Vostoka Kazakhstana [Environmentally safe methods for controlling the number of the Colorado potato beetle using entomopathogenic fungi in the conditions of the South-East of Kazakhstan] *Ízdeníster, nótizheler – Issledovaniya, rezul'taty*. Almaty, № 4 (76). – pp. 436-442.
- 21 Smagulova Sh. B., Duisembekov B. A., Slyamova N. D., Uspanov A.M., Lednev G. R., Levchenko M. V., (2017) Entomopatogennyye anamorfnyye askomitsety v populyatsiyakh zhukovkoroyedov v Yugo-Vostochnom Kazakhstane i otsenka ikh spetsifichnosti [Entomopathogenic anamorphic ascomycetes in beetle-eating populations in South-Eastern Kazakhstan and assessment of their specificity] *Ízdeníster, nótizheler – Issledovaniya, rezul'taty*. №4 (76). – pp. 449-457.
- 22 Smagulova Sh.B., Uspanov A.M., Slyamova ND, Duysembekov B.A. (2010) Zavisimost' smertnosti lichinok koloradskogo zhuka ot kontsentratsii inokulyuma shtammov entomopatogennogo griba *Beauveria bassiana* [The dependence of the mortality of Colorado potato beetle larvae on the concentration of inoculum of strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*] *Biologicheskiye nauki Kazakhstana* № 2, – pp. 69-74.
- 23 Smagulova SH. B., Makarov Ye. M., Baymagambetov Ye. ZH., Abdukadyrova A.D., Bolatbekova B. KH. (2015) Opredeleniye effektivnosti shtammov entomopatogennogo griba roda *Beauveria* v podavlenii chislennosti lichinok koloradskogo zhuka [Determination of the effectiveness of strains of the entomopathogenic fungus of the genus *Beauveria* in suppressing the number of Colorado potato beetle larvae] *Innovatsionnyye ekologicheski bezopasnyye tekhnologii zashchity rasteniy. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii* (24-25 sentyabrya 2015 g.). – Almaty, – pp.640-643.
- 24 Shternshis M.V. (2010) Entomopatogeny – osnova biopreparatov dlya kontrolya chislennosti fitofagov [Entomopathogens – the basis of biological products for controlling the number of phytophages] – Novosibirsk: NGAU, – pp.157.

- 25 Tabakovic-Tosic M.V., Golubovicurgus, D. (2011) Tosic New technological methods in the integrated forest protection in the Republic of Serbia. Integrated plant protection: strategy and tactics. – Nesvizh. – pp. 49-55.
- 26 The Manual of Biocontrol Agents (2004) – BCPC. – pp. 702.
- 27 Tserodze M., Meskhi N. (2015) Biological control of winter moth. Innovative and ecologically safe technologies in plant protection. Almaty, – pp. 246-248.
- 28 Tsibulska A.I. (1972) Primeneniye rizhskogo shtamma griba beloy muskardiny v bor'be s koloradskim zhukom [The use of the Riga white muscardine mushroom strain in the fight against the Colorado potato beetle]. Patologiya na-sekomykh i kleshchey. – Riga, – pp.155.
- 29 Tsvetkova V.P., Shpatova T.V., Lelyak A.A., Shternshis M.V. (2016) Vliyaniye entomopatogenного гриба Beauveria bassiana na bolezni kartofelya i yagodnykh kul'tur [Influence of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana on diseases of potatoes and berry crops] Biologicheskaya zashchita rasteniy – osnova stabilizatsii agroekosistem. – Krasnodar, – vyp.9. – pp.311-313.
- 30 Voytka D.V., Yankovskaya Ye. N., YUzefovich Ye. K., Gerasimovich M. S. (2016) Kollektcionnyy fond mikroorganizmov kak nauchnaya osnova biotekhnologicheskikh razrabotok dlya zashchity rasteniy [Collection fund of microorganisms as a scientific basis for biotechnological developments for plant protection] Sostoyaniye i perspektivy zashchity rasteniy. Materialy 232 Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. – Minsk, – pp.51-54.
- 31 Veyzer YA. Mikrobiologicheskii metod bor'by s vrednymi nasekomymi [Microbiological method of combating harmful insects].- M.: Kolos, – pp.639.
- 32 Yankovskaya U.N., Prishchepa L.I., Ugnachova Ye.V. (2011) Biologicheskaya aktivnost' entomopatogenного гриба Lecanicillium lecanii po otnosheniyu k fitofagam teplichnykh kul'tur [Biological activity of the entomopathogenic fungus Lecanicillium lecanii in relation to phytophages of greenhouse crops] Integrirovannaya zashchita rasteniy: strategiya i taktika. – Minsk – Nesvizh, – pp.386-387.
- 33 Yankovskaya E.N., Voitka D.V. (2016) Biologicheskii kontrol' fitofagov teplichnykh kul'tur preparatom na os-nove entomopatogenного гриба Lecanicillium lecanii Gams & Zare [Biological control of phytophages of greenhouse crops with a preparation based on the entomopathogenic fungus Lecanicillium lecanii Gams & Zare] Biologicheskaya zashchita rasteniy – osnova stabilizatsii agroekosistem. – Krasnodar, – vyp.9. – pp.330-332.
- 34 Yegorova N.S. (1989) Promyshlennaya mikrobiologiy [Industrial microbiology] Ucheb. pos. dlya vuzov. Pod red. Yegorova N.S. – M.: Vyssh. shk. -1989. pp. 688.
- 35 Zhumatayeva U.T., Duisembekov B.A., Begalieva A.M., Sabdenova U.O., Yerkekulova K.K. (2021) Screening of collection strains (collections) of entomopathogenic fungi against asian locusts for signs of virulence. Research, results. No.1 (89). – pp. 225-235

E.G. Krupa^{1,2*}, **M.O. Aubakirova¹**, **S.M. Romanova¹**

¹Institute of Zoology of Republic of Kazakhstan, Kazakhstan, Almaty

²Kazakh Agency of Applied Ecology, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: elena_krupa@mail.ru

SEASONAL DYNAMICS OF ENVIRONMENTAL VARIABLES AND ZOOPLANKTON STRUCTURE IN WASTEWATER RESERVOIRS OF THE RIGHT-BANK SORBULAK CANAL SYSTEM

The annual increase in wastewater volumes necessitates comprehensive studies of water bodies subsidized by anthropogenic activities. An example of such reservoirs is Sorbulak and a system of shallow ponds into which pre-treated wastewater from Almaty and its environs is discharged. The published works provide fragmentary data on the hydrochemical and hydrobiological regimes of Sorbulak and ponds. There is no information on the seasonal dynamics of these variables. Our paper, aimed at studying the seasonal dynamics of pollutants and the zooplankton structure, partially fills this gap. Environmental and biological samples were taken in Sorbulak and two ponds by standard methods once a month, from April to September of 2021. The content of nutrients was high, and the heavy metals concentrations, except for copper, were low. The seasonal dynamics of pollutants in reservoirs were determined mainly by their entry from wastewater, with a more negligible contribution of natural factors. Zooplankton was represented by 80 species with an average abundance of 177.3-834.4 thousand ind./m³ and average biomass of 9.6-10.4 g/m³. The values of the Shannon index were 1.98-2.12 bit/ind and 0.88-1.76 bit/mg, the average mass of an individual was 0.0140-0.0853 mg. The seasonal dynamics of zooplankton in the surveyed water bodies were different. The obtained results and comparison with the data of previous studies testified to the instability of the species composition of zooplankton communities both during one year and in individual years. Contradictions between the structure of zooplankton communities and the chemical variables of the studied reservoirs were identified. The results obtained to make a theoretical and practical contribution to understanding the formation of water quality in reservoirs with mixed pollution emphasize the need for further comprehensive studies of reservoirs of this type, and show specific differences between anthropogenic and natural successions of aquatic ecosystems.

Key words: waste water reservoirs, pollution, seasonal dynamics, zooplankton.

Е.Г. Крупа^{1,2*}, М.О. Аубакирова¹, С.М. Романова¹

¹ҚР БҒМ ҒК «Зоология институты» РМҚ, Қазақстан, Алматы қ.

²«Қазақстан қолданбалы экология агенттігі» ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: elena_krupa@mail.ru

Сарқынды су жинақтауыш сорбұлақ каналы оң жағалауы жетектерінің гидрохимиялық көрсеткіштерімен зоопланктон құрылымының маусымдық динамикасы

Сарқынды сулар көлемінің жыл сайынғы ұлғаюы антропогендік қызмет есебінен субсидияланатын су қоймаларды жан-жақты зерттеу қажеттілігін негіздейді. Мұндай су қоймалардың бірі – Алматы қаласы мен оның маңайынан алдын ала тазартылған сарқынды сулар келіп түсетін Сорбұлақ сарқынды суқоймалар жүйесі. Бұл су қоймалар уақыт өте келе өзгеретін, ластанудың аралас түрімен сипатталады. Осыған дейінгі жарияланған жұмыстарда Сорбұлақ пен сарқынды су жинақтауыш тоғандар жүйесінің гидрохимиялық және гидробиологиялық режимі туралы үзінді деректер келтіріледі, бірақ бұл көрсеткіштердің маусымдық динамикасы туралы мәліметтер жоқ. Ластаушы заттардың маусымдық динамикасын және зоопланктондық қауымдастықтардың құрылымын зерттеуге бағытталған бұл жұмыс жоғарыда аталған олқылықтың орнын толтырады. Сорбұлақ пен сарқынды су жинақтауыш екі тоғанның кешенді зерттеулері 2021 жылы жүргізілді, оның химиялық құрамын, қоректік заттар мен ластаушы заттардың құрамын зерттеу үшін су үлгілері, сондай-ақ зоопланктон сынамалары стандартты әдістермен айына бір рет, сәуірден қыркүйекке дейін іріктелді. Талдаудың әрбір түріне барлығы 84 сынама іріктелді. 2021 жылғы зерттеулер нәтижесі қоректік және органикалық заттардың мөлшері жоғары екендігін, ал мыстан басқа ауыр металдардың мөлшері төмен екендігін көрсетті. Зерттелген сарқынды суларды жинақтауыш суқоймаларда ластаушы заттардың маусымдық

динамикасы негізінен олардың табиғи факторлардың үлесі аз болған кезде ағынды сулармен келіп түсуімен анықталды. Зоопланктон 80 түрмен сипатталды, олардың орташа саны 177,3-834,4 мың экз/м³ және орташа биомассасы 9,6-10,4 г/м³. Шеннонның алуантүрлілік индексінің мәні 1,98-2,12 бит/экз және 0,88-1,76 бит/мг, дараның орташа салмағы 0,0140 – 0,0853 мг болды. Зерттелген су қоймалардың әрқайсысында зоопланктонның сандық және құрылымдық көрсеткіштерінің маусымдық динамикасы әртүрлі болды. Алынған нәтижелер мен алдыңғы зерттеулердің деректерімен салыстыру зоопланктон қауымдастықтарының түрлер құрамының бір жыл ішінде де, жекелеген жылдары да тұрақсыздығын көрсетті. Зоопланктондық қауымдастықтардың құрылымы мен зерттелген су объектілерінің химиялық көрсеткіштері арасындағы қайшылықтар анықталды. Алынған нәтижелер аралас ластануы бар су қоймалардағы су сапасының қалыптасуын түсінуге теориялық және практикалық үлес қосады, осы типтегі су объектілерін одан әрі кешенді зерттеу қажеттілігін атап көрсетеді, сондай-ақ су экожүйелерінің антропогендік және табиғи сукцессия арасындағы белгілі бір айырмашылықтарды көрсетеді.

Түйін сөздер: сарқынды су жинақтауыштар, ластану, маусымдық динамика, зоопланктон.

Е.Г. Крупа^{1,2*}, М.О. Аубакирова¹, С.М. Романова¹

¹РГП на ПХВ «Институт зоологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

²ООО Казахское Агентство Прикладной Экологии, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: elena_krupa@mail.ru

Сезонная динамика количественных и структурных показателей зоопланктона в сточных водах системы правобережного Сорбулакского канала

Ежегодное увеличение объемов сточных вод обуславливает необходимость всесторонних исследований водоемов, субсидируемых за счет антропогенной деятельности. Примером таких водоемов являются Сорбулак и система мелководных прудов, в которые сбрасываются предварительно очищенные сточные воды г. Алматы и его окрестностей. Водоемы характеризуются смешанным характером загрязнения, которое изменяется во времени. В опубликованных работах приводятся отрывочные данные о гидрохимическом и гидробиологическом режиме Сорбулака и прудов, но сведения о сезонной динамике этих показателей отсутствуют. Данная работа, направленная на исследование сезонной динамики загрязняющих веществ и структуры зоопланктонных сообществ, частично восполняет этот пробел. Комплексные исследования Сорбулака и двух прудов были проведены в 2021 г. Образцы воды для исследования ее химического состава, содержания питательных и загрязняющих веществ, а также пробы зоопланктона отбирали стандартными методами один раз в месяц, с апреля по сентябрь. Всего на каждый вид анализа было отобрано по 84 пробы. Было показано, что в 2021 г. содержание питательных и органических веществ было высоким, а содержание тяжелых металлов, за исключением меди, находилось на низком уровне. Сезонная динамика загрязняющих веществ в водоемах сточных вод определялась в основном их поступлением со сточными водами при меньшем вкладе природных факторов. Зоопланктон был представлен 80 видами со средней численностью 177,3-834,4 тыс. экз./м³ и средней биомассой 9,6-10,4 г/м³. Значения индекса разнообразия Шеннона были равны 1,98-2,12 бит/инд и 0,88-1,76 бит/мг, средняя масса особи – 0,0140-0,0853 мг. Сезонная динамика количественных и структурных показателей зоопланктона в каждом из обследованных водоемов была различной. Полученные результаты и сравнение с данными предыдущих исследований свидетельствовали о нестабильности видового состава сообществ зоопланктона как в течение одного года, так и в отдельные годы. Выявлены противоречия между структурой зоопланктонных сообществ и химическими показателями исследованных водоемов. Полученные результаты вносят теоретический и практический вклад в понимание формирования качества воды в водоемах со смешанным загрязнением, подчеркивают необходимость дальнейших комплексных исследований водоемов такого типа, а также показывают определенные различия между антропогенными и естественными сукцессиями водных экосистем.

Ключевые слова: накопители сточных вод, загрязнение, сезонная динамика, зоопланктон.

Introduction

The growth of the earth's population causes an annual increase in the volume of wastewater containing a complex set of organic and toxic compounds [1-4]. A significant part of wastewater

is discharged into natural water bodies [5-6], causing considerable damage to biological resources and human health [7-8]. The growing practice of reusing wastewater in agriculture and drinking water [9-10] increases environmental and human health risks.

Pollutants entering aquatic ecosystems with wastewater undergo transformation. These processes are determined by a complex of natural and climatic factors [11], chemical and physical interactions [13-15], morphometric characteristics of water bodies [16], as well as accumulation in living organisms [17-20]. The impact of wastewater on aquatic ecosystems depends both on its origin [industrial, agricultural, livestock, domestic wastewater] and on the composition of biological communities [21-25]. Depending on the concentration, pollutants can stimulate or inhibit living organisms [26-28].

Anthropogenic activities almost entirely subsidize artificial reservoirs created to store wastewater (wastewater reservoirs). The continuous influx of organic and toxic compounds with wastewater causes differences between wastewater reservoirs and natural water bodies, characterized by a seasonal supply of nutrients and pollutants [29-30]. In emergency discharges, the content of contaminants in wastewater can increase many times over a short period, which is also not typical for natural water bodies.

The natural processes of eutrophication of water bodies associated with the accumulation of organic matter are distorted by toxic compounds in wastewater. By suppressing the reproduction of primary producers [31], toxicants disrupt the transformation of nutrients and directly or indirectly affect the entire trophic pyramid. As a result, traditional bioindication methods based on the relationship of species to organic pollution [32-33] become ineffective under conditions of toxic or mixed pollution of water bodies. It should also be taken into account that the diverse nature of chemical interactions between pollutants [34] does not allow one to assess water quality based on chemical methods alone.

Hydrobiological studies of wastewater reservoirs expand our knowledge about the formation features of biological communities' structures under conditions of organics together with toxic pollution. According to the feedback principle, the results obtained can be used to assess the ecological state of artificial and natural water bodies with mixed pollution. Considering the annual growth of wastewater volumes [1,4], there are more and more such water bodies [5-6].

Sorbulak is one of the largest wastewater reservoirs in Kazakhstan and the world [35]. Sorbulak and ponds store pre-treated wastewater from the city of Almaty and its environs, with a

total population of about 2 million people. Even after preliminary treatment, wastewater contains organic, biogenic, suspended solids, surfactants, metals, phenols, fats, dyes, oil products, cyanides, formaldehyde, and heavy metals [35-38].

Zooplankton studies in the Sorbulak reservoir were carried out in 1998, 2000, 2001, and 2017 [36, 39-41]. The cited papers provide information on the species composition, quantitative and structural variables of zooplankton communities in the Sorbulak reservoir and ponds. The interannual dynamics of zooplankton in ponds are analyzed in connection with external factors [37]. Still, there is no information on the seasonal dynamics of pollutants and the structure of zooplankton communities. This work partially fills this gap. Its purpose is to analyze the seasonal variability of environmental and biological variables in conditions of mixed pollution of wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system.

Materials and Methods

Description of Study area. Sorbulak is located 50 km northwest of Almaty. It was formed in 1973 by filling the natural lowering of the relief with untreated sewage. Sorbulak has the shape of an irregular triangle. The island (former peninsula) divides the reservoir into two parts (Figure 1). The water area is about 58 km². Depths range from 19.0-25.0 m in the northern part to 1.5-5.0 m in the southern and southeastern parts. The wastewater canal flows into the southeast of the reservoir. From the western bay of Sorbulak, water is periodically taken through the canal for irrigation of industrial crops.

By the end of the 80s of the last century, the filling of Sorbulak reached a critical level, and there was a threat of the dam breaking. In 1995, the emergency Right-Bank Sorbulak Canal (RSC) was built. Through this canal, part of the wastewater, bypassing Sorbulak, can be discharged into a system of 8 shallow ponds (RSC ponds). Ponds have an indented coastline (Figure 1). The largest of them is the penultimate one (No. 7) and the last one (No. 8), with an area of 3.5 and 0.4 km², respectively. The maximum depths do not exceed 7-8 m, with average depths of 2.7-6.0 m. Water transparency is often low. The water level in wastewater reservoirs mainly depends on the volume of incoming wastewater. During the observation period of 2021, the water level in all wastewater reservoirs has dropped significantly.



Figure 1 – The layout of sampling stations in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

Field studies. Hydrochemical and biological sampling was carried out once a month from April to September 2021 using a grid of 15 stations (Figure 1). The coordinates, depth, temperature, pH value, and water transparency at each station were determined. The pH value and water temperature were measured using a portable waterproof instrument AMTAST. Water transparency was determined using a Secchi disk. Water samples were taken to assess total dissolved solids (TDS), the content of nitrites, nitrates, phosphates, ammonium, total iron, silicon, manganese, phosphorus, oxygen, easily oxidized organic substances (PI), heavy metals (Cd, Pb, Zn, Cu, Cr, Co). At depths less than 3 m, hydrochemical samples were taken from the surface and at greater depths, layer by layer, using a bathometer. Samples for determination of TDS were taken in plastic containers with a volume of 1 l, heavy metals – 0.5 l, nutrients – in glass containers with a volume of 0.5 l, permanganate index (PI) – 0.25 l, oxygen – in oxygen bottles with a ground stopper with a volume of 0.25 l. Zooplankton samples were taken using a Judy net by pulling it from the bottom to the surface [42]. All zooplankton samples were fixed with 4% formaldehyde solution. A total of 84 samples were taken for each type of analysis.

Laboratory analysis. Chemical analysis of water was carried out according to guidelines [43,44]. Nitrogen compounds, phosphates, silicon, manganese, and iron were determined photometrically using Griess, Nessler, metallic cadmium, ammonium molybdate in combination with ascorbic and sulfosalicylic acids. The content of easily oxidizable organic substances was determined under acidic conditions by the Kubel

method. The total hardness of water was determined by the volumetric complexometric method with the black eriochrome indicator. The determination of heavy metals in water was carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry on an ELAN-9000 quadrupole mass spectrometer USA (ST RK ISO 17294-1-2011) in the low-background measurement laboratory of the Institute of Nuclear Physics (Almaty).

Identification of planktonic invertebrates species was carried out according to keys [45-48]. According to [49], the abundance of organisms was calculated. The sample was concentrated to a certain volume, depending on the abundance of organisms. After thorough mixing, three subsamples were taken from the sample using a 1 ml pipette. In this subsample, all encountered individuals and age stages of individual species (the most numerous) were counted. Next, the sample was concentrated to a smaller volume of 125-150 ml. Three subsamples were again taken from it; less abundant age stages or species were counted. In the end, the sample, with its volume of 20-25 ml, was examined to count large and rare species of planktonic invertebrates. The results obtained were recalculated per 1 m³. We used an individual mass of individuals/species determined by the formulas to calculate the biomass [50]. The average number of species per sample, the Shannon index (Shannon Ab, bit/ind and Shannon Bi, bit/mg), and the average mass of an individual (mg) were determined to characterize the structure of zooplankton. The Shannon index was calculated in the Primer Software based on a logarithm with base two. Graphs of the seasonal dynamics of variables were plotted in the R program [51-52].

Statistical analysis. The calculation of the similarity of the species composition of plankton communities was performed as a network analysis in JASP 0.9.0.0 (Jeffrey's Amazing Statistics Program, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands) in the botnet package in R-Statistica (R Core Team, Vienna, Austria) at a similarity level of 50% at $p < 0.05$ [53]. Blue lines mean positive correlation, red lines mean negative correlation. The thicker the line, the stronger the connection strength. Descriptive statistics were performed in Excel. The frequency of species occurrence was found by dividing the number of samples in which the species was encountered by the total number of samples.

Results and Discussion

Hydrophysical and hydrochemical characteristics. All wastewater reservoirs are thermal. The ponds, as a rule, warmed up more strongly compared to Sorbulak. The water is alkaline, with maximum pH values in ponds. The water in the ponds is slightly mineralized (Table 1). In Sorbulak, the value of the variable is more than twice as high. According to its chemical composition, the water belonged to the chloride class, the sodium group of the second type. Only in April, sulfates prevailed in Sorbulak. The oxygen content in the surface was at a high level.

Table 1 – Physical-chemical variables of wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021 (average values with standard error)

Variable	Sorbulak	RSC 7	RSC 8
temperature, °	21.7±0.6	25.7±0.01	22.7±0.7
pH	9.41±0.03	9.51±0.05	10.00±0.07
oxygen, mg/dm ³	11.95±0.70	11.50±1.61	12.20±1.00
TDS, mg/dm ³	1340.0±20.3	546.2±26.9	464.5±16.0
hardness, mg-eq/dm ³	6.20±0.03	3.70±0.12	2.64±0.09
PI, mgO/dm ³	19.07±0.54	17.36±1.04	16.22±1.03
N-NO ₂ , mg/dm ³	0.05±0.01	0.13±0.05	0.03±0.01
N-NO ₃ , mg/dm ³	0.68±0.07	3.00±1.31	1.28±0.57
N-NH ₄ , mg/dm ³	0.30±0.04	0.37±0.12	0.53±0.13
PO ₄ , mg/dm ³	0.26±0.01	0.39±0.05	0.14±0.02
Si, mg/dm ³	3.69±0.15	8.26±0.57	7.03±0.38
Mn, mg/dm ³	0.03±0.003	0.05±0.01	0.07±0.01
Fe, mg/dm ³	0.34±0.02	0.37±0.03	0.38±0.03
Cd, mg/dm ³	0.0001±0.000002	0.0001±0.000002	0.0001±0.000002
Co, mg/dm ³	0.0002±0.00001	0.0003±0.00004	0.0002±0.00001
Cr, mg/dm ³	0.0070±0.0003	0.0060±0.0009	0.0050±0.0005
Cu, mg/dm ³	0.0115±0.0011	0.0255±0.0090	0.0359±0.0041
Pb, mg/dm ³	0.0010±0.0032	0.0008±0.0003	0.0007±0.0002
Zn, mg/dm ³	0.0053±0.0004	0.0110±0.0027	0.0085±0.0014

The average content of nitrates, ammonium, phosphates, silicon, and manganese in the ponds was higher, and easily oxidized organic substances were lower than in Sorbulak. The contents of Cd,

Co, Cr, and Pb were low or very low. A somewhat increased amount of Zn was recorded in RSC 7. The Cu content was universally high, with maximum values in RSC 8.

The following features characterized the seasonal dynamics of hydrochemical variables. The surface water temperature gradually increased from April to August and decreased in September (Figure 2). In Sorbulak, water transparency increased

from 0.4-0.5 m in spring to 1.9 m in autumn. In RSC 8, the average value of the variable fluctuated within 0.1-0.4 m. In RSC 7, the maximum water transparency was noted in April, the minimum – in July.

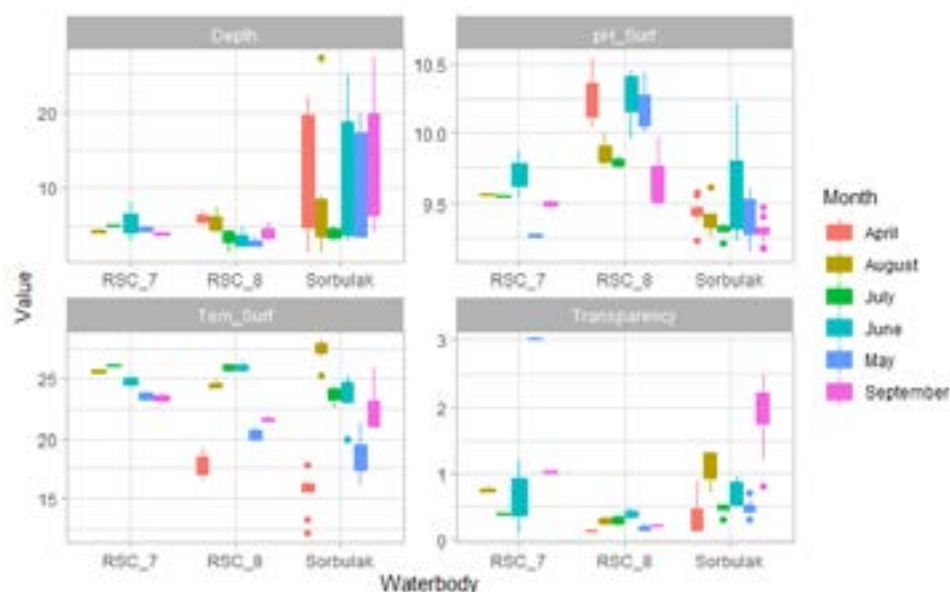


Figure 2 – Seasonal dynamics of hydrophysical variables in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

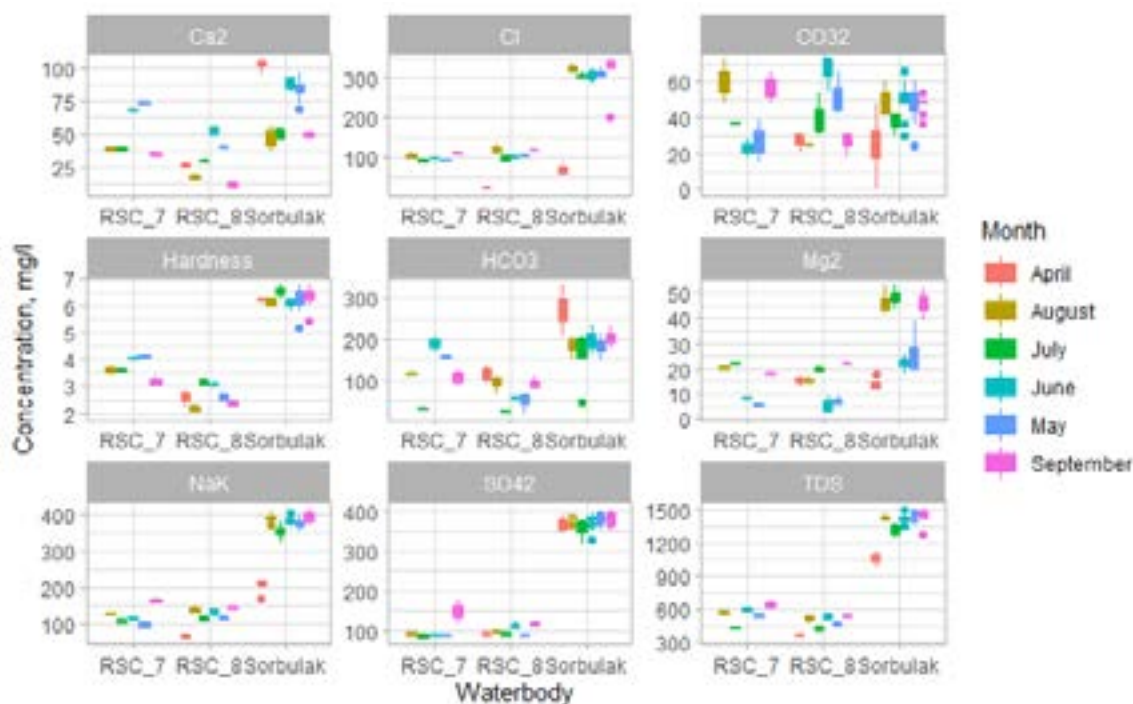


Figure 3 – Seasonal dynamics of hydrochemical variables in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

The minimum oxygen content in the surface in Sorbulak and RSC 7 was recorded in July and RSC 8 in August. The maximum TDS water in all wastewater reservoirs was recorded in September against a decrease in water level (Figure 3).

The most considerable amount of easily oxidized organic substances ($21.07\text{--}25.00\text{ mg/dm}^3$) entered the wastewater reservoirs in May, with a minimum in April and September ($11.67\text{--}15.00\text{ mg/dm}^3$).

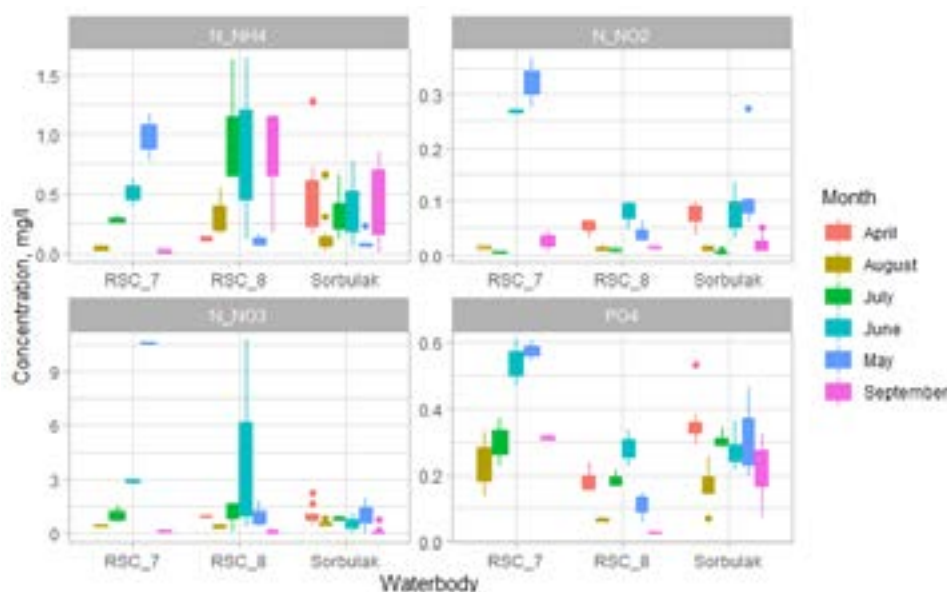


Figure 4 – Seasonal dynamics of nutrients in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

The seasonal dynamics of nitrogen and phosphorus compounds in Sorbulak did not follow clear patterns, with a weakly expressed trend of decreasing their concentrations from April to September. In RSC 7, this trend was more pronounced: the content of nitrogen compounds and phosphates decreased from spring to autumn (Figure 4). In RSC 8, the maximum concentrations of nutrients were recorded in June, and ammonium nitrogen – in July.

During the study period, the content of zinc, copper, and lead changed to a certain extent synchronously (Figure 5). The Pearson correlation coefficient values were statistically significant between Zn and Cu ($r=0.657$), Zn and Pb ($r=0.682$), Cu and Pb ($r=0.432$, $p<0.05$). In Sorbulak, the highest amount of copper was recorded in June, in ponds – in August. In August, a relatively high amount of chromium was detected in Sorbulak.

Zooplankton

As part of zooplankton, 80 species were recorded, including 53 rotifers, 16 cladocerans, 9 copepods, and 2 others (Table 2). The most significant number

of species was found in RSC 8, and the minimum in RSC 7.

During the entire observation period, the zooplankton species composition was characterized by a relatively high similarity between Sorbulak and ponds (Figure 6). The allocation of RSC 8 to a separate cluster indicated an almost complete change in the species composition of planktonic invertebrates in August and September relative to other periods of research.

According to the average values, the quantitative variables of zooplankton communities were at a high level, with a maximum in RSC 8 and Sorbulak (Table 3). Copepods dominated. Rotifers and cladocerans subdominated. In RSC 7, the distribution of taxonomic groups by abundance was relatively uniform. The average zooplankton biomass did not differ in water bodies. Cladocerans dominated in Sorbulak and RSC 7, while copepods subdominated. In RSC 8, the ratio of groups in the total zooplankton biomass was reversed.

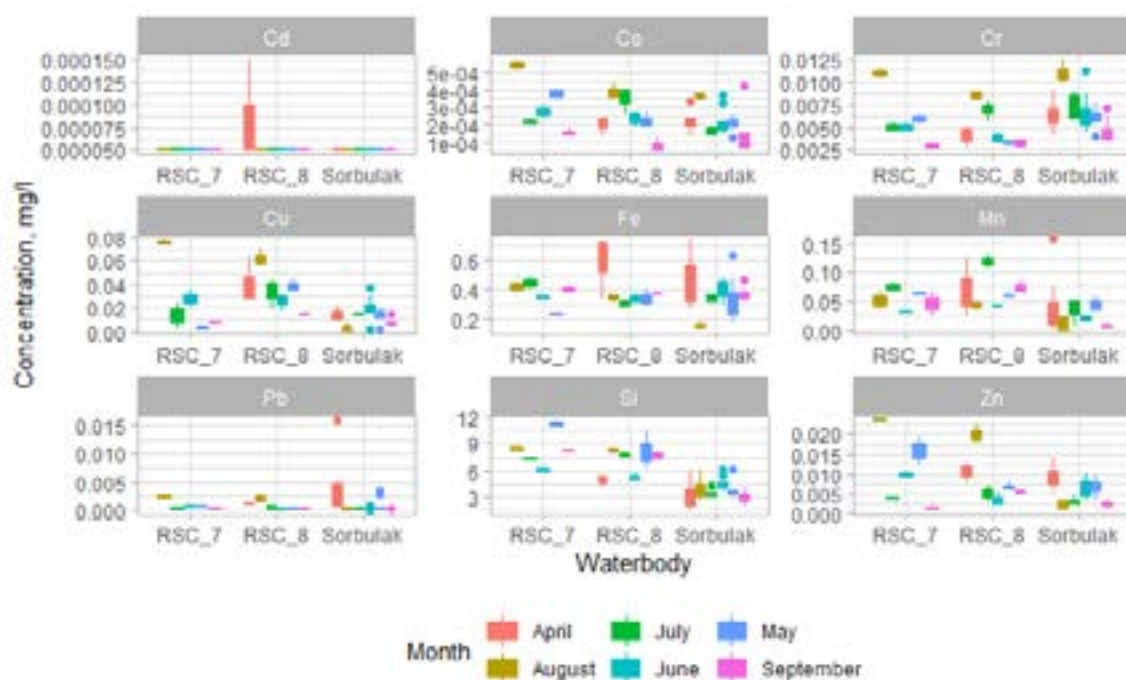


Figure 5 – Seasonal dynamics of heavy metals and silicon in wastewater reservoirs of the system of the Right-Bank Sorbulak Canal, 2021

Table 2 – Species composition and frequency of occurrence (%) of planktonic invertebrates in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

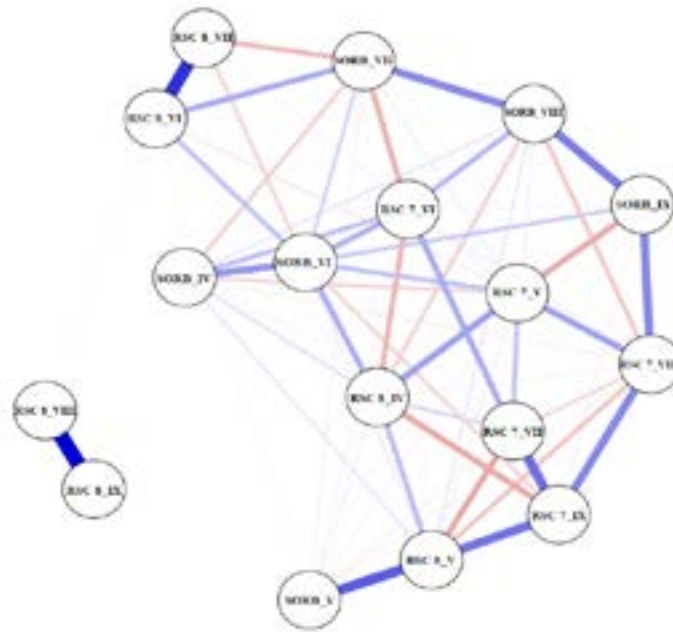
Species name	Sorbulak	RSC 7	RSC 8
Rotifera			
<i>Anuraeopsis fissa</i> (Gosse)			17
<i>Asplanchna brightwelli</i> (Gosse)			33
<i>Asplanchna girodi</i> (Guerne)	41		33
* <i>Asplanchna herricki</i> (Guerne)	2		
* <i>Asplanchna intermedia</i> (Hudson)	7		6
<i>Bdelloida</i> gen.sp.	4		22
<i>Brachionus angularis</i> (Gosse)			50
<i>Brachionus angularis bidens</i> (Plate)			33
* <i>Brachionus calyciflorus</i> (Pallas)	2		17
<i>Brachionus calyciflorus amphiceros</i> (Ehrenberg)			44
<i>Brachionus forficula</i> (Wierzejski)		20	67
* <i>Brachionus plicatilis</i> (Muller)	6		6
* <i>Brachionus quadridentatus ancylognathus</i> (Schmarda)	4		33
<i>Brachionus quadridentatus hyphalmyros</i> (Tschugunoff)			17
* <i>Brachionus urceus</i> (Linnaeus)	2		22
<i>Brachionus variabilis</i> (Hempel)			11

Table continuation

Species name	Sorbulak	RSC 7	RSC 8
<i>Colurella colurus</i> (Ehrenberg)			22
* <i>Euchlanis deflexa</i> (Gosse)	2		
<i>Euchlanis dilatata</i> (Ehrenberg)	2		6
<i>Euchlanis lyra</i> (Hudson)			6
* <i>Euchlanis phryne</i> (Myers)	4	10	
<i>Euchlanis pyriformis</i> (Gosse)			6
<i>Filinia longiseta</i> (Ehrenberg)	2		50
* <i>Filinia major</i> (Colditz)	37	10	50
* <i>Filinia terminalis</i> (Plate)	35		83
<i>Hexarthra mira</i> (Hudson)	19	40	
* <i>Hexarthra intermedia</i> (Wiszniewski)	63	20	17
<i>Keratella cochlearis</i> (Gosse)			22
* <i>Keratella quadrata</i> (Muller)	96	60	83
<i>Keratella tropica</i> (Apstein)			11
<i>Keratella tropica reducta</i> (Fadeew)			6
<i>Lecane (Monostyla) bulla</i> (Gosse)			22
<i>Lecane (Monostyla) closterocerca</i> (Schmarda)			17
<i>Lecane (s.str.) luna</i> (Muller)	13		44
<i>Lepadella (s.str.) triptera</i> (Ehrenberg)			11
<i>Leydigia leydigii</i> (Schoedler)	2		
* <i>Lophocharis oxysternon</i> (Gosse)	2		
* <i>Mytilina ventralis</i> (Ehrenberg)	6		22
* <i>Notommata collaris</i> (Ehrenberg)	2		
Notommatidae gen.sp.	2	20	28
* <i>Polyarthra dolichoptera</i> (Idelson)	22		17
<i>Polyarthra major</i> (Burchhardt)	13		
<i>Pompholyx sulcata</i> (Hudson)	17		50
<i>Synchaeta kitina</i> (Roussel.)	37		
<i>Synchaeta stylata</i> (Wierzejski)	19		
* <i>Trichocerca (s.str.) caspica</i> (Tschugunoff)	11		33
<i>Trichocerca rattus</i> (Muller)			17
<i>Trichocerca similis</i> (Wierzejski)			28
* <i>Trichocerca stylata</i> (Gosse)	2		
<i>Trichotria similis</i> (Stenroos)	2		
<i>Trichotria truncata</i> (Whitel.)			6

Table continuation

Species name	Sorbulak	RSC 7	RSC 8
<i>Tripleuchlanis plicata</i> (Rodew.)			6
Cladocera			
* <i>Alona rectangula</i> (Sars)	11	30	17
* <i>Bosmina (Bosmina) longirostris</i> (O.F. Muller)	98	10	94
* <i>Ceriodaphnia dubia</i> (Richard)	2		
<i>Ceriodaphnia pulchella</i> (Sars)	2		
* <i>Ceriodaphnia reticulata</i> (Jurine)	17		
<i>Chydorus sphaericus</i> (O.F. Muller)	31	100	22
<i>Daphnia (Daphnia) galeata</i> (G.O. Sars)	96		39
* <i>Daphnia (Daphnia) longispina</i> (O.F. Muller)	20		
<i>Daphnia (Ctenodaphnia) magna</i> (Straus)	78	80	17
<i>Daphnia (Daphnia) pulex</i> (De Geer)	74	100	44
<i>Diaphanosoma cf. dubium</i> (Manuilova)			72
* <i>Diaphanosoma mongolianum</i> (Veno)	63	10	6
<i>Macrothrix hirsuticornis</i> (Norman et Brady)		10	
<i>Moina brachiata</i> (Jurine)	2		
<i>Moina</i> sp.			6
<i>Pleuroxus aduncus</i> (Jurine)	4	20	
Copepoda			
<i>Acanthocyclops robustus</i> (Mirabdullayev et Defaye)	100	80	67
<i>Cyclops scutifer</i> (Sars)			
* <i>Cyclops strenuus</i> (Fischer)	31		22
* <i>Cyclops vicinus</i> (Uljanin)	98	50	89
* <i>Eucyclops serrulatus</i> (Lilljeborg)	2	40	
* <i>Mesocyclops leuckarti</i> (Claus)		10	
* <i>Thermocyclops vermifer</i> (Lindberg)			61
<i>Sinodiaptomus sarsi</i> (Rylov)		20	67
Diaptomidae gen.sp.		10	28
Ergasilidae gen.sp.	7		
Others			
Oligochaeta gen.sp.	2	10	
Ostracoda gen.sp.	2	90	17
Nematoda gen.sp.	2		6
Total:	52	23	57
Note. *Species not previously recorded in Sorbulak and ponds.			



Abbreviation. Sorb – Sorbulak, RSC 7 and 8 – pond 7 and 8. Roman numbers (IV-IX) denote the months of April-September, respectively.

Figure 6 – The similarity of the species composition of planktonic invertebrates in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

Table 3 – Quantitative variables of zooplankton communities in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

Variable	Water body			Variable	Water body		
	Sorbulak	RSC 7	RSC 8		Sorbulak	RSC 7	RSC 8
Rotifera Abundance	152.1	51.9	334.6	Copepoda Biomass	2.89	0.47	6.55
Cladocera Abundance	140.7	69.3	83.2	Total Biomass	9.62	10.37	9.72
Copepoda Abundance	405.0	56.6	416.5	Average Species Number	12.0	8.5	17.4
Total Abundance	697.8	177.3	834.4	Shannon Ab	2.01	1.98	2.12
Rotifera Biomass	0.12	0.05	0.74	Shannon Bi	1.76	0.88	1.31
Cladocera Biomass	6.61	9.83	2.44	Average mass of an individual	0.0175	0.0853	0.0142

The seasonal dynamics of the quantitative indicators of zooplankton had their characteristics in each water body (Figures 7, 8). In Sorbulak, after the maximum in April, an abundance of planktonic invertebrates decreased in May and June, followed by a rise in July and a further decline by September. In RSC 7, the quantitative indicators of zooplankton gradually increased from May to September. In RSC 8, two zooplankton abundance peaks (May and September) and one biomass peak (June) were recorded.

The composition of the dominant species in the zooplankton of the surveyed reservoirs included the cyclopoid copepods *A. robustus* everywhere,

in Sorbulak together with *C. vicinus* (Table 4). As the water temperature rose seasonally, the role of heat-loving species of cladocerans increased in the zooplankton community, while the importance of rotifers *S. kitina* decreased. The composition of the dominant species in the zooplankton of RSC 8 was the most peculiar and variable. In addition to the cyclops *A. robustus*, the rotifers *F. major*, *F. terminalis*, *K. quadrata*, and the cyclops *C. vicinus* played a significant role in the zooplankton of this reservoir in spring, and the predatory rotifer *A. brightwelli*, crustaceans *B. longirostris*, *D. dubium*, and *S. sarsi*.

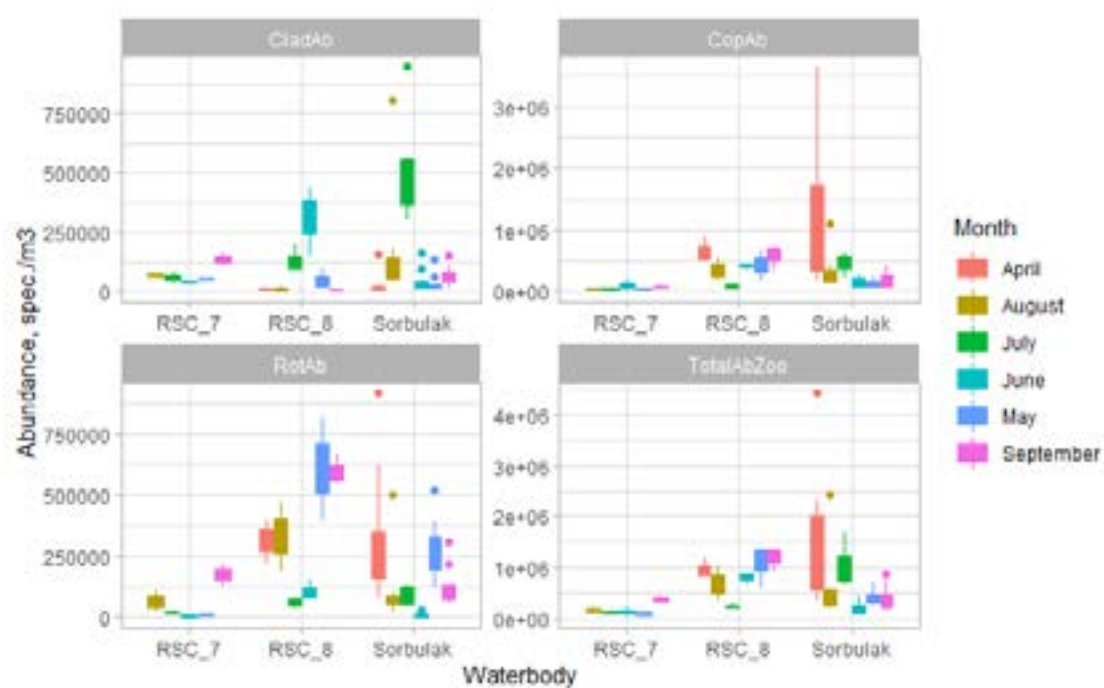


Figure 7 – Seasonal dynamics of zooplankton abundance in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

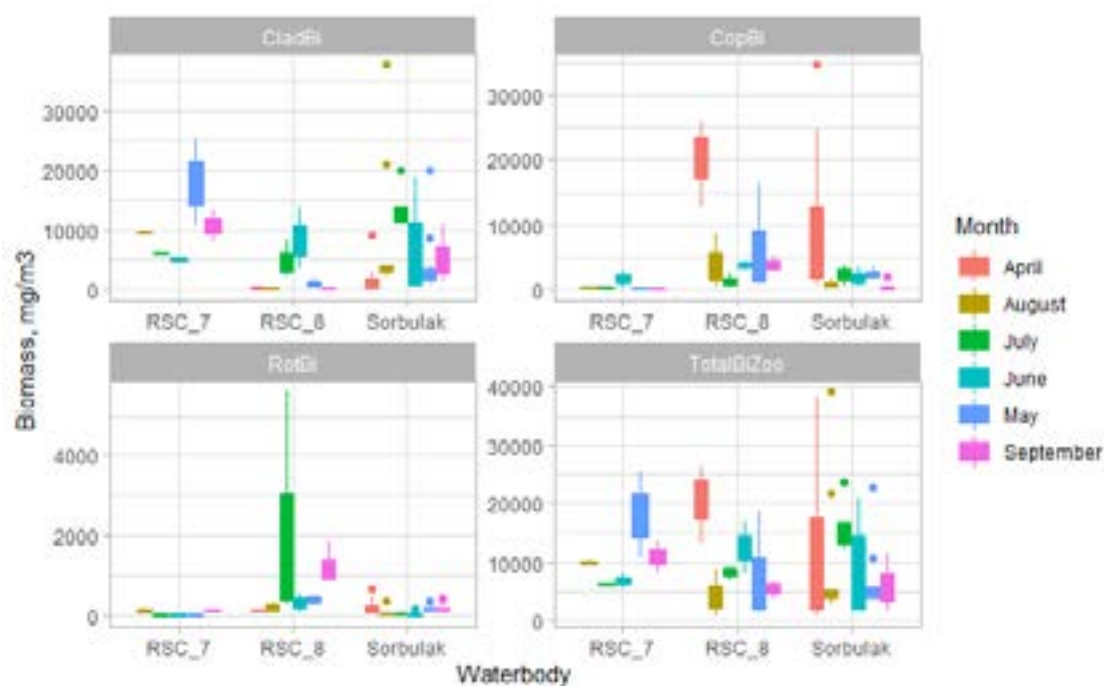


Figure 8 – Seasonal dynamics of zooplankton biomass in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

Table 4 – The composition of the dominant species in the zooplankton of wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

Water body	Month	Species name	Abundance, %	Biomass, %
Sorbulak	April	<i>Synchaeta kitina</i>	12.5	1.1
		<i>Daphnia (Daphnia) galeata</i>	1.5	13.8
		<i>Cyclops vicinus</i>	17.5	76.4
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	58.9	5.1
	May	<i>Filinia major</i>	17.1	0.5
		<i>Keratella quadrata</i>	41.5	1.9
		<i>Daphnia (D.) galeata</i>	7.7	57.3
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	11.6	0.9
		<i>Cyclops vicinus</i>	16.5	33.5
	June	<i>Daphnia (C.) magna</i>	3.6	64.4
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	53.1	9.9
		<i>Cyclops vicinus</i>	22.5	11.7
	July	<i>Bosmina (B.) longirostris</i>	24.8	13.5
		<i>Diaphanosoma mongolianum</i>	19.4	45.3
		<i>Daphnia (D.) pulex</i>	1.0	13.3
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	33.7	12.1
	August	<i>D. mongolianum</i>	12.9	43.7
		<i>Daphnia (Daphnia) pulex</i>	3.7	31.3
		<i>A. robustus</i>	55.5	7.3
	September	<i>Acanthocyclops robustus</i>	26.4	7.8
		<i>Daphnia (Daphnia) pulex</i>	15.9	50.7
		<i>D. mongolianum</i>	2.5	26.2
RSC 7	May	<i>Daphnia (C.) magna</i>	17.5	61.2
		<i>Daphnia (D.) pulex</i>	30.1	38.2
		<i>Cyclops vicinus</i>	32.1	0.17
	June	<i>Acanthocyclops robustus</i>	70.2	24.1
		<i>Daphnia (C.) magna</i>	2.9	34.7
		<i>Daphnia (D.) pulex</i>	15.1	39.3
	July	<i>Chydorus sphaericus</i>	29.6	8.6
		<i>Daphnia (D.) pulex</i>	21.7	84.6
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	36.4	3.5
	August	<i>Hexarthra mira</i>	31.4	1.1
		<i>Daphnia (Daphnia) pulex</i>	29.1	93.3
		<i>A. robustus</i>	22.0	3.1
	September	<i>Keratella quadrata</i>	36.1	0.9
		<i>Chydorus sphaericus</i>	19.6	10.5
		<i>Daphnia (Daphnia) pulex</i>	15.9	87.5
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	18.0	0.6

Table continuation

Water body	Month	Species name	Abundance, %	Biomass, %
RSC 8	April	<i>Filinia major</i>	16.2	0.3
		<i>Filinia terminalis</i>	11.0	0.1
		<i>Cyclops vicinus</i>	62.4	96.7
	May	<i>Keratella quadrata</i>	42.5	4.5
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	17.6	4.3
		<i>Cyclops vicinus</i>	22.2	77.9
	June	<i>Bosmina (Bosmina) longirostris</i>	16.0	5.7
		<i>Diaphanosoma cf. dubium</i>	19.3	58.5
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	32.4	10.7
		<i>Sinodiaptomus sarsi</i>	7.6	10.3
	July	<i>Asplanchna brightwelli</i>	5.8	25.7
		<i>Diaphanosoma dubium</i>	46.9	57.4
		<i>Acanthocyclops robustus</i>	13.9	2.7
		<i>Sinodiaptomus sarsi</i>	7.8	12.4
	September	<i>Brachionus forficula</i>	35.0	0.7
		<i>Thermocyclops vermifer</i>	46.3	30.2
		<i>Sinodiaptomus sarsi</i>	3.8	59.7
	September	<i>Brachionus forficula</i>	36.2	2.3
		<i>Asplanchna girodi</i>	1.9	19.3
		<i>Thermocyclops vermifer</i>	49.1	69.9

Figure 9 shows the seasonal dynamics of the structural variables of zooplankton communities. The highest values of the Shannon index and the average mass of an individual in all reservoirs were recorded in the summer months. In Sorbulak, the species richness of zooplankton communities increased from April to September, and it was at its maximum in the summer months in the ponds.

The seasonal dynamics of nitrogen and phosphorus compounds in the surveyed wastewater reservoirs did not follow clear patterns, which is associated with the predominant supply of biogenic elements to the reservoirs with wastewater. A weakly pronounced downward trend in nitrogen and phosphorus concentrations from April to September indicates a specific contribution of surface runoff, the volume of which is associated with seasonal variability in precipitation [54]. In the absence of seasonal patterns, the synchronous change in the concentrations of heavy metals is also associated with their joint inflow with wastewater.

With territorial proximity and feeding on one source, the structure and seasonal dynamics

of zooplankton communities in the surveyed wastewater reservoirs had specific features. With a relatively high commonality of the species composition of planktonic invertebrates, the composition of the dominant species was specific in each of the reservoirs and unstable over time. Species compounds also changed compared with previous data [37,41]. By 2021, the species richness of zooplankton in Sorbulak increased due to 18 species of rotifers, three species of cladocerans, and one species of copepods that were not previously recorded (Table 3). All species of rotifers recorded in 2017, except for *Hexarthra mira*, fell out of the composition of the zooplankton of the ponds; and the composition of rotifers was completely renewed. Previously unrecorded, three species of cladocerans and four species of copepods appeared. A possible reason for a significant increase in the species richness of zooplankton in reservoirs may be the excessive supply of biogenic elements that stimulate the development of phytoplankton. Favorable trophic conditions allow a more significant number of planktonic invertebrate species to

exist simultaneously [55]. This conclusion is also supported by an increase in zooplankton species richness due to rotifers from the genera *Brachionus*, *Keratella*, and *Filinia*, which are characteristic of water bodies enriched in biogenic elements

[37]. Seasonal and interannual variability in the species composition of planktonic invertebrates is a reflection of unstable environmental conditions, which is generally typical for water bodies fed by wastewater [10].

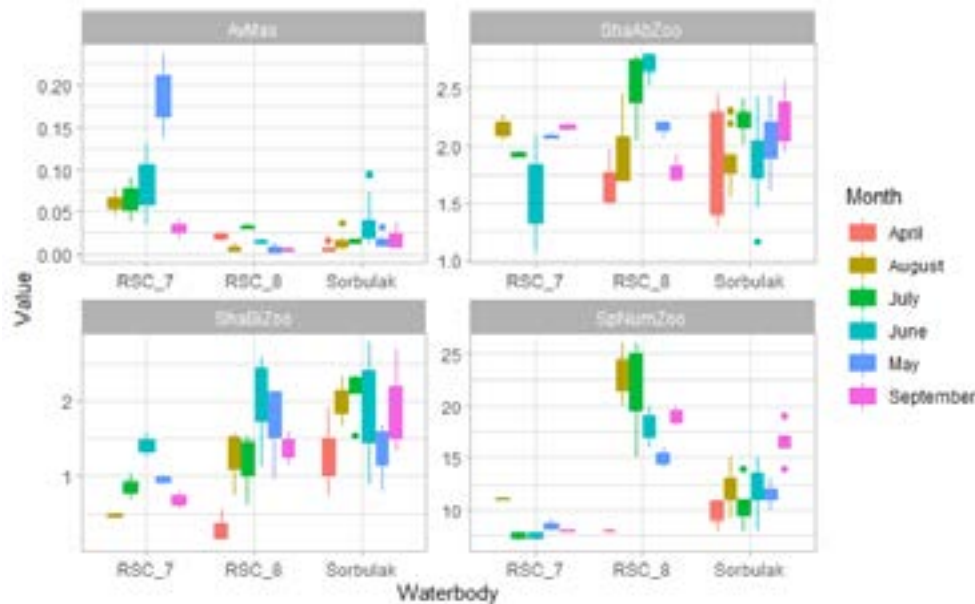


Figure 9 – Seasonal dynamics of structural variables of zooplankton in wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system, 2021

The constant influx of nutrients contributed to maintaining a high abundance and biomass of zooplankton in the surveyed wastewater reservoirs, which is generally typical for water bodies of this type [56-57]. The decrease in the level of toxic pollution of reservoirs in recent decades played a significant role [37,41]. At very low concentrations of all metals in 2021, the copper content increased from 0.001 mg/dm³ in 2017 [37] to 0.0117-0.0359 mg/dm³ in 2021. The primary source of heavy metals in wastewater is an activity of industrial enterprises [58], including the textile industry. From 2019 to 2021, the production of textiles in Almaty increased from 5.0 to 23.7% [59]. The use of heavy metals and, in particular, copper for fabric dyeing may be one of the reasons for the sharp increase in the content of this metal in wastewater in the past few years.

Except RSC 8, the dominant zooplankton complex did not change in all wastewater reservoirs. In RSC 8, only the cyclops *A. robustus* remained among the dominants of previous years. In contrast, the previously dominant rotifers *Hexarthra mira*

and cladocerans *D. pulex* and *D. magna* dropped out of the composition of dominants. The number of species resistant to organic pollution (*Asplanchna girodi*, *A. brightwelli*, *B. forficula*, *Keratella quadrata*, *B. longirostris*, *D. dubium*, *C. vicinus*, *S. sarsi*, *T. Vermifer*) increased [37, 60-62]. Changes in the composition of dominant complexes can be associated with the variability of hydrochemical conditions [63] and antagonistic relationships between planktonic invertebrates. For example, in a mesotrophic lake in Brazil, *B. longirostris* cannot coexist with rotifers *Hexarthra* [64]. Due to the great competition, rotifers are forced to look for additional sources of food. *Hexarthra* uses the food contained in the filtration apparatus of *B. longirostris*, thereby negatively affecting the population of this crustacean. Perhaps for this reason, in 2017, *B. longirostris* was not recorded in the zooplankton of RSC 7 and 8 during the period of dominance of the rotifer *Hexarthra mira* [37,41]. The absence of *B. longirostris* in Sorbulak [37, 40] may also be related to its inability to compete for food with large *D. magna* [65-66].

The Shannon diversity index and the average individual mass are integral variables that characterize the structure of biological communities [33]. In 2021, the average values of the Shannon index (1.98-2.12 bit/ind and 0.88-1.76 bit/mg) indicated a moderate and low diversity of zooplankton communities in the wastewater reservoirs. Such index values are typical for zooplankton in eutrophic lakes [33, 67], where several small-sized species dominate and for oligotrophic conditions when several large species dominate [62]. High values of the average individual mass (0.0142-0.0853 mg) in the zooplankton of all wastewater reservoirs corresponded to the values characteristic of oligotrophic conditions [33]. Taking into account the long-term accumulation of pollutants [35] and the results of chemical analysis in 2021, it can be concluded that the values of the integral variables of zooplankton did not fit into the existing classifications [33, 62]. Our results once again confirm that the successions of water bodies differ significantly under the influence of natural and anthropogenic factors. The differences are not only in the multiple accelerations of anthropogenic eutrophication of water bodies [68], but also in the stochastic effect of toxic compounds that shift the aquatic ecosystem to earlier stages of successional development [69]. Obviously, it is the main reason for the contradictions described above between the structure of zooplankton communities and the chemical parameters of the studied water bodies. Undoubtedly, our results are preliminary and aimed at drawing attention to the study of the succession of wastewater bodies as a particular type of aquatic ecosystem.

Conclusion

The seasonal dynamics of pollutants in the wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system are determined mainly by their inflow with wastewater, with a smaller contribution of

natural factors. Zooplankton was represented by 80 species, of which the most common rotifers *Keratella quadrata*, cladocerans *Bosmina longirostris*, *Daphnia magna*, *D. pulex*, cyclopoid copepods *Acanthocyclops robustus*, and *Cyclops vicinus*. High quantitative variables of zooplankton (177.3-834.4 thousand ind./m³ and 9.6-10.4 g/m³) are mainly characteristic of reservoirs enriched with nutrients. The composition of the dominant complexes included species that endure an increased amount of organic matter. Shannon diversity index values ranged from 1.98 to 2.12 bits/ind and 0.88 to 1.76 bits/mg. The average individual mass in zooplankton was 0.0142-0.0853 mg. The seasonal zooplankton dynamics had their characteristics in each surveyed water body. The obtained results and comparison with the data of previous studies testified to the instability of the species composition of zooplankton communities, which may reflect the variability of environmental conditions. The identified contradictions between the structure of zooplankton communities and the chemical parameters of the examined water bodies emphasize the need for further comprehensive studies of water bodies with mixed pollution and show certain differences between anthropogenic and natural successions of aquatic ecosystems.

Acknowledgments

The work was carried out under project no. AP08855655 “Assessment of the ecological state of wastewater storages of the system of the Right-Bank Sorbulak Canal for the development of the scientific basis for wastewater disposal”, Institute of Zoology, the Committee of Science, Ministry of Education and Science, Republic of Kazakhstan.

The authors are grateful to Georg Hormann (Germany, Kiel University) for teaching the basics of working in the R program.

References

- 1 Berenzen, N., Hümmer, S., Liess, M., Schulz, R. “Pesticide Peak Discharge from Wastewater Treatment Plants into Streams During the Main Period of Insecticide Application: Ecotoxicological Evaluation in Comparison to Run off.”. Bull. Environ. Contam. Toxicol 70. (2003): 891–897.
- 2 Kaboosi, K. “The assessment of treated wastewater quality and the effects of mid-term irrigation on soil physical and chemical properties (case study: Bandargaz-treated wastewater).” Appl Water Sci 7. (2017): 2385–2396.
- 3 Benfares, R., Seridi, H., Belkacem, Y., Inal A. “Heavy Metal Bioaccumulation in Brown Algae *Cystoseira compressa* in Algerian Coasts, Mediterranean Sea.” Environ. Process 2. (2015):429–439.
- 4 Rogowska, J., Cieszynska-Semenowicz, M., Ratajczyk, W., Wolska, L. “Micropollutants in treated wastewater” Ambio 49. (2020):487–503.

- 5 Valipour, M., Singh, V.P. "Global Experiences on Wastewater Irrigation: Challenges and Prospects." In *Balanced Urban Development: Options and Strategies for Liveable Cities*, edited by Maheshwari B., Singh V., Thoradeniya B., 327. Cham: Springer, 2016.
- 6 Shukri, A.A., Kyambadde, J., Hawumba, J.F. "The impact of Kalerwe abattoir wastewater effluent on the water quality of the Nsooba Channel." *Agri. Res. and Tech. Open Access J* 6, 1. (2017):6-13.
- 7 Kawser, A.M., Baki, M.A., Kundu, G.K. et al. *Human health risks from heavy metals in fish of Buriganga river. Bangladesh: SpringerPlus*, 2016.
- 8 Overstreet, R.M., Hawkins, W.E. "Diseases and Mortalities of Fishes and Other Animals in The Gulf of Mexico. In: *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill*, edited by Ward, C., 1738. New York: Springer, 2017.
- 9 Mudgal, S., van Long, L., Saidi, N., Haines, R., McNeil, D., Jeffrey, P., Smith, H., Knox, J. *Optimization Water Reuse in EU*. Brussels: BIO by Deloitte, 2015.
- 10 Angelakis, A.N., Snyder Shane, A. "Wastewater Treatment and Reuse: Past, Present, and Future." *Water*, 7, 9. (2015):4887–4895.
- 11 Singh, S., Malik, D., Thakur, J., Kaur, A., Singh, R.K., Nijhawan, S. "A Comparative Analysis of the Physico-chemical Properties and Heavy Metal Pollution in Three Major Rivers across India." *International Journal of Science and Research (IJSR)* 3, 8. (2014):1938–1941.
- 12 Li, H., Shi A., Li, M., Zhang, X. "Effect of pH, Temperature, Dissolved Oxygen, and Flow Rate of Overlying Water on Heavy Metals Release from Storm Sewer Sediments." *Journal of Chemistry* 2013. (2013):1–11.
- 13 Caporale, A.G.; Violante, A. "Chemical Processes Affecting the Mobility of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments." *Curr Pollution Rep* 2. (2016):15–27.
- 14 Hutchinson, T. C., William, F. "Effect of H ion activity and Ca on the toxicity of metals in the environment." *Environmental Health Perspectives* 25. (1978):47-52.
- 15 Shikhaleeva, G.N., Chursina, O. D., Shikhaleev, I. I., Kiryushkina, A.N., Kuzmina, I.S. "Physico-Chemical Institute for the Protection of the Environment and Man Spatio-time distribution of heavy metals in bottom sediments of the southern part of the Kuyal'nitsky liman." *Bull of ONU Chem* 19. (2014):59–69.
- 16 Maksimovich, N.G., Pyankov, S.V. *Small reservoirs: ecology and safety*. Perm: Perm State National Research University, 2012.
- 17 Fritioff, A., Kautsky, L., Greger, M. "Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants." *Environmental Pollution* 133. (2005):265–274.
- 18 Abalaka, SE. "Heavy metals bioaccumulation and histopathological changes in *Auchenoglanis occidentalis* fish from Tiga dam, Nigeria." *J Environ Health Sci Eng* 6, 13. (2015):1–8.
- 19 Matache, M.L., Marin, C., Rozyłowicz, L., Tudorache A. *Plants accumulating heavy metals in the Danube River wetlands. J Environ Health Sci Engineer* 11. (2013):1–39.
- 20 Hassanzadeh, M., Zarkami, R., Sadeghi, R. "Uptake and accumulation of heavy metals by water body and *Azolla filiculoides* in the Anzali wetland." *Applied Water Science* 11. (2021):1–12.
- 21 Razak, S.B. Abd., Sharip, Z. "Spatio-temporal variation of zooplankton community structure in tropical urban waterbodies along trophic and urban gradients." *Ecol Process* 8. (2019):1–8.
- 22 Utz, L. R. P., Bohrer-Morel, M. B. C. "Characterization of the Zooplankton Community of the Secondary Wastewater Treatment System of an Oil Refinery in Southern Brazil." *Biociências, Porto Alegre* 16, 1. (2008):1–14.
- 23 Biancalana, F., Menéndez, M. C., Berasategui, A. A., Fernández-Severini, M.D., Hoffmeyer, M. S. "Sewage pollution effects on mesozooplankton structure in a shallow temperate estuary." *Environ Monit Assess* 184, 6. (2012):3901–3913.
- 24 Muthulakshmi, A.L., Natesan, U., Ferrer, V.A., Deepthi, K., Venugopalan, V. P., Narasimhan, S.V. "Impact assessment of nuclear power plant discharge on zooplankton abundance and distribution in coastal waters of Kalpakkam, India." *Ecol Process* 8. (2019):1–22.
- 25 Ju, YR., Lo, WT., Chen, CF., Chen, C.W., Huang, Z.L., Dong, C.D. "Effect of metals on zooplankton abundance and distribution in the coast of southwestern Taiwan." *Environ Sci Pollut Res* 26. (2019):33722–33731.
- 26 Vecchione, M. "Zooplankton Distribution in Three Estuarine Bayous with Different Types of Anthropogenic Influence." *Estuaries* 12, 3. (1989):169–179.
- 27 Holopainen, I.J., Holopainen, AL., Hämäläinen, H., Rahkola-Sorsa, M., Tkatcheva, V., Viljanen, M. "Effects of mining industry waste waters on a shallow lake ecosystem in Karelia, north-west Russia." *Hydrobiologia* 506. (2003): 111–119.
- 28 Saha, S., Saha, T., Basu, P. "Seasonal Changes in Zooplankton and Macro-fauna Populations of the East Calcutta Wetland Fish Ponds." *Proc Zool Soc* 70. (2017):156–164.
- 29 Ukolova, O.E., Sviridenko, V.D. "The seasonal dynamics of the biogenic elements in the lake Kurilskoye." *The researches of the aquatic biological resources of Kamchatka and the North–West Part of the Pacific Ocean* 15. (2009):5–20.

- 30 Zaderev, E.S., Tolomeev, A.P., Drobotov A.V., Kolmakova A.A. "Influence of weather conditions on the spatial and seasonal dynamics of dissolved and suspended biogenic elements in the water column of the meromictic lake Shira." *Siberian ecological journal* 4. (2014):515-530
- 31 Wang, WX. "Prediction of metal toxicity in aquatic organisms." *Chin Sci Bull* 58. (2013):194-202.
- 32 Sládeček, V. System of water quality from the biological point of view. *Arch Hydrobiol Ergeb Limnol* 3. (1973):218.
- 33 Andronnikova, I.N. Structural and functional organization of zooplankton in lake ecosystems of different trophic types. St. Petersburg: Nauka, 1996.
- 34 Moore, J.V., Ramamurthy, S. Heavy metals in natural waters: Monitoring and impact assessment. M.: Mir, 1987.
- 35 Dostay, J.D., Tyumenev, S.D. Management of water supply and sanitation of the city of Almaty. Almaty: EuroPrint, 2009.
- 36 Krupa, E.G., Matmuratov, S.A. "Quantitative development and sex structure of *Acanthocyclops robustus* (Copepoda, Cyclopoida) populations in water bodies of southeastern Kazakhstan." *Aqua Zoological Research* 5. (2002):191-194.
- 37 Krupa, E., Barinova, S., Romanova, S., Aubakirova, M., Ainabaeva, N. "Planktonic invertebrates in the assessment of long-term change in water quality of the Sorbulak wastewater disposal system (Kazakhstan)." *Water* 12, 3409. (2020):1-24.
- 38 Bekkazinova, D.B., Aleksanova, A.G. "The content of heavy metals (Cd, Zn, Co, Ni, Cu) in the wastewater of the city of Almaty." *Bulletin of the Kazakh National Medical University* 4. (2010):168-171.
- 39 Matmuratov, S.A., Bragin, B.I., Stuge, T.S., Troshina, T.T., Akberdina, G.Zh., Krupa, E.G. (1998). To the assessment of the ecological situation in the area of discharges of the Right-bank Sorbulak Canal in the Ili River // *Geographical foundations of sustainable development of the Republic of Kazakhstan: mater. intl. conf. institute of zoology*. – Almaty, – P. 281-286.
- 40 Kiseleva, V.A. "Seasonal dynamics of hydrocenoses of the Small Sorbulak Lake (Almaty region) as a probable cause of summer-autumn migration of migratory birds." *Selevinia* 1, 4. (2014):137-143.
- 41 Aubakirova, M., Krupa E.G. "Comprehensive assessment of the ecological state of wastewater reservoirs of the Right-Bank Sorbulak Canal system." *Bulletin of KazNU. Series Biological* 2, 79. (2019):120-128.
- 42 Kiselev, I.A. "Research methods of plankton." In *Life of the Fresh Water of the USSR*, edited by Pavlovsky, E.N., Zhadin, V.I., Moscow/Leningrad: Academy of Sciences, 1956.
- 43 Semenova, A.D. ed. Guidance on the chemical analysis of surface waters of the land. L.: Gidrometeoizdat, 1977.
- 44 Fomin, G.S. Water. Control of chemical, bacterial, and radiation safety according to international standards. M.: NPO «Alternativa», 1995.
- 45 Borutsky, E.V., Stepanova, L.A., Koss, M.S. Key to Calanoida fresh waters of the USSR. St. Petersburg: Nauka, 1991.
- 46 Kutikova, L.A. Rotifers of the fauna of the USSR. Leningrad: Nauka, 1964.
- 47 Rylov, V.M. Fauna of the USSR. Crustaceans. Cyclopoida of fresh water bodies. M.: Nauka, 1948.
- 48 Tsalolikhin, S.Ya. ed. Key to freshwater invertebrates in Russia and adjacent territories. St. Petersburg: Institute of Zoology, 1995.
- 49 Vinberg, G.G., Lavrent'eva, G.M. ed. Zooplankton and its products: guidelines for the collection and processing of materials for hydrobiological studies in freshwater reservoirs. L.: Nauka, 1984.
- 50 Balushkina, E.V., Vinberg G.G. Relationship between the length and body weight of planktonic crustaceans // In the book: *Experimental and field studies of the biological foundations of lake productivity*. L.: Zoological Institute, 1979.
- 51 Mastitsky, S.E., Shitikov, V.K. Statistical Analysis and Data Visualization with R. (2014) <http://r-analytics.blogspot.com>
- 52 Kabacoff, R. R in Action. Connecticut: Manning Publications Co, 2011.
- 53 Love, J., Selke, R., Marsman, M., Jamil, T., Dropmann, D., Verhagen, A.J., Ly, A., Gronau, Q.F., Smira, M., Epskamp, S. "JASP: Graphical statistical software for common statistical designs." *Journal of Statistical Software* 88. (2019):1-17.
- 54 Dolgov, S.V., Koronkevich, N.I., Barabanova, E.A. "Modern changes in surface runoff and infiltration of water on agricultural land in the forest-steppe and steppe zones of the Russian Plain and their consequences." *Water Industry of Russia* 4. (2018):78-91.
- 55 Vuorio, K., Järvinen, M., Kotamäki, N. "Phosphorus thresholds for bloom-forming cyanobacterial taxa in boreal lakes." *Hydrobiologia* 847. (2019): 4389-4400.
- 56 Gasiunaite, Z.R., Olenina, I. "Zooplankton-phytoplankton interactions: A possible explanation of the seasonal succession in the Kuršiu Marios lagoon." *Hydrobiologia* 363. (1998):333-339.
- 57 Pogozhev, P.I., Gerasimova, T.N. "The Role of Zooplankton in the Regulation of Phytoplankton Biomass Growth and Water Transparency in Water Bodies Polluted by Nutrients." *Water Resour* 38. (2011):400-408.
- 58 Yakovleva, A., Klyvenok, M., Vovk, O. "Reduction of heavy metals content in wastewaters during treatment process." *Proceedings of the NAU* 2. (2012):104-106.
- 59 Abishev, U.S. (2020) Report on the results of marketing research. Textile production Nursultan. / <https://atameken.kz/uploads/content/files/>
- 60 Rietzler, A.C., Espindola, E.L. "Microcystis as a food source for copepods in a subtropical eutrophic reservoir." *Verh Intern Ver Limnol* 26. (1998):2001-2005.
- 61 Landa, G.G., Barbosa, F.A., Rietzler, A.C., Maia-Barbosa, P.M. "Thermocyclops decipiens (Kiefer, 1929) (Copepoda, Cyclopoida) as Indicator of Water Quality in the State of Minas Gerais, Brazil." *Braz. Arch. Biol. Technol* 50. (2007):695-705.

- 62 Krupa, E.G., Ainabaeva, N.S., Aubakirova, M.O. Guidelines (guidelines) for assessing the ecological state of water bodies in terms of biological and chemical indicators. Almaty: MPK Kristall, 2017.
- 63 John, B.R., Arp, C.D., Claudia, E.T., Benjamin, M.J., Matthew, S.W., Thoma, R.R., Erin, E.S., David, M.O., Kyle, C.S. "Potential shifts in zooplankton community structure in response to changing ice regimes and hydrologic connectivity." *Arct. Antarct. Alp. Res* 51. (2019):327-345.
- 64 Jaramillo-Londono, J. C., Pinto-Coelho, R. M. "Interaction between *Hexarthra intermedia* (Rotifera) and *Bosmina longirostris* (Cladocera): a case of opportunistic nutrition or interference competition?." *Journal of Plankton Research* 32, 6. (2010):961–966.
- 65 Wejnerowski, L., Cerbin, S., Dziuba, M.K. "Setae thickening in *Daphnia magna* alleviates the food stress caused by the filamentous cyanobacteria." *Aquat. Ecol* 51. (2017):485–498.
- 66 Adamczuk, M. "Past, present, and future roles of small cladoceran *Bosmina longirostris* (O. F. Müller, 1785) in aquatic ecosystems." *Hydrobiologia* 767. (2016):1–11.
- 67 Muñoz-Colmenares, M.E., Soria, J.M., Vicente, E. "Can zooplankton species be used as indicators of trophic status and ecological potential of reservoirs?." *Aquat Ecol* 55. (2021):1143–1156.
- 68 Serrano, L., Reina, M., Quintana, X. D., Romo, S., Olmo, C., Soria, J. M., Pätzig, M. "A new tool for the assessment of severe anthropogenic eutrophication in small shallow water bodies." *Ecological Indicators* 76. (2017):324–334.
- 69 Bhat, S., Qayoom, U. "Implications of Sewage Discharge on Freshwater Ecosystems. Sewage – Recent Advances, New Perspectives and Applications." edited by: Zhang T., 142. Beijing:China Agricultural University, 2021.

5-бөлім
**АДАМ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР
ФИЗИОЛОГИЯСЫ**

Section 5
**HUMAN AND ANIMAL
PHYSIOLOGY**

Раздел 3
**ФИЗИОЛОГИЯ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

А.Қ. Шоқан^{1,2*}, Н.О. Кудрина^{1,2}, Д.Ю. Корулькин¹,
Н.В. Терлецкая^{1,2}, Т.Е. Кулманов²

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Генетика және физиология институты, Қазақстан, Алматы қ.

*e-mail: aksholpan.shokan@gmail.com

RUMEX TIANSCHANICUS L. НЕГІЗІНДЕГІ БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ КЕШЕНДЕРДІҢ ҚАСИЕТТЕРІН СОЗЫЛМАЛЫ УЫТТЫЛЫҚ ТӘЖІРИБЕСІНДЕ ЗЕРТТЕУ

Rumex tianschanicus L. – халық медицинасында асқазан-ішек жолдары, бауыр, диарея, іш кату, тері ауруларында қолданылатын дәрілік өсімдік [1,2]. Дәстүрлі медицинада дәрілік өсімдіктердің кең таралғанына қарамастан, олардың кейбіреулері ғана тиімділігі мен қауіпсіздігіне тексерілген [3]. Осыған байланысты бұл жұмыстың мақсаты *Rumex tianschanicus* L. тамырлары мен тамырсабақтарынан алынған сығындының биологиялық белсенді кешендерінің қасиеттерін созылмалы уыттылық тәжірибесінде бағалау болды. Фитохимиялық талдау өнімділігі жоғары сұйықты хроматография (ӨЖСХ) әдісімен жүргізілді. Сығындының биологиялық белсенді кешенін ӨЖСХ әдісімен талдау нәтижесінде оның құрамы анықталды: 84,9% антрахинон гликозидтері, 14,7% антрахинон агликондары, 0,4% нафтахинондар. Тәжірибе топтарының жануарларына *Rumex tianschanicus* L. сығындысы 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг әртүрлі дозада 21 күн бойы *per os* берілді. Дене салмағы, тамақ пен суды қабылдау, қанның биохимиялық және гематологиялық көрсеткіштері бағаланды. Сығынды асқазан-ішек жолдарының және бауырдың қызметіне жанама әсер еткен жоқ, бұл егеуқұйрықтардағы гематологиялық және биохимиялық қан талдауының нәтижелерімен анықталды. Сондықтан *Rumex tianschanicus* L. негізіндегі сығынды *per os* енгізілгенде қауіпсіз және терапевтік қолдану үшін зерттелуі қажет.

Түйін сөздер: *Rumex tianschanicus* L., уыттылық, егеуқұйрық, гематология, биохимия.

A.K. Shokan^{1,2*}, N.O. Kudrina^{1,2}, D.Yu. Korulkin¹,
N.V. Terletskaia^{1,2}, T.E. Kulmanov²

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

²Institute of Genetics and Physiology, Kazakhstan, Almaty

*e-mail: aksholpan.shokan@gmail.com

Study of the properties of biologically active complexes based on *Rumex tianschanicus* L. in the experience of chronic toxicity

Rumex tianschanicus L. is a medicinal plant used in folk medicine for diseases of the gastrointestinal tract, liver, diarrhea, constipation, and skin diseases [1,2]. Despite the widespread use of medicinal plants in traditional medicine, only a few of them have been tested for efficacy and safety [3]. In this regard, the purpose of this work was to evaluate the properties of biologically active complexes isolated from the roots and rhizomes of *Rumex tianschanicus* L. in the experience of chronic toxicity. Phytochemical analysis was carried out by HPLC. As a result of high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the phytocomplex, its composition was established: 84.9% anthraquinone glycosides, 14.7% anthraquinone aglycones, 0.4% naphthaquinones. Animals of the experimental groups were administered *Rumex tianschanicus* L. extract orally at different doses of 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg for 21 days. The extract had no direct effect on the functions of the gastrointestinal tract and liver, which is confirmed by the results of hematological and biochemical blood tests in rats. Thus, the extract based on *Rumex tianschanicus* L. was found to be safe when administered orally and should be studied as a therapeutic agent.

Key words: *Rumex tianschanicus* L., toxicity, rat, hematology, biochemistry.

А.К. Шоқан^{1,2*}, Н.О. Кудрина^{1,2}, Д.Ю. Коренькин¹,
Н.В. Терлецкая^{1,2}, Т.Е. Кулманов²

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Институт генетики и физиологии, Казахстан, г. Алматы

*e-mail: aksholpan.shokan@gmail.com

Изучение свойств биологически активных комплексов на основе *Rumex tianschanicus* L. в эксперименте по хронической токсичности

Rumex tianschanicus L. – лекарственное растение, используемое в народной медицине при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, печени, поносах, запорах и кожных заболеваниях. Несмотря на широкое распространение лекарственных растений в народной медицине, лишь некоторые из них прошли испытания на эффективность и безопасность. В связи с этим целью настоящей работы явилась оценка свойств биологически активных комплексов, выделенных из корней и корневищ *Rumex tianschanicus* L. в эксперименте по хронической токсичности. Фитохимический анализ проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ. В результате ВЭЖХ анализа фитокомплекса установлен его состав: 84.9% антрахиноновых гликозидов, 14.7% антрахиноновых агликонов, 0.4% нафтахинонов. Животным опытных групп вводили перорально экстракт *Rumex tianschanicus* L. в разных дозах – 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг в течение 21 сутки. Экстракт не оказывал прямого влияния на функции ЖКТ и печени, что подтверждается результатами гематологического и биохимического анализов крови у крыс. Таким образом, экстракт на основе *Rumex tianschanicus* L. оказался безопасным при пероральном введении и должен быть изучен как средство для терапевтического применения.

Ключевые слова: *Rumex tianschanicus* L., токсичность, крыса, гематология, биохимия.

Кіріспе

Көптеген ауруларды емдеудің тиімділігін арттыру жолдарының бірі дәрілік өсімдік шикізатынан алынған препараттарды қолдану болып табылады [4-6]. Соңғы жылдары алғашқы медициналық-санитарлық көмекте дәрілік өсімдіктерді қолданудың маңыздылығы арта түсті [7], себебі, жер шарының тұрғындарының 80% әртүрлі ауруларды емдеу үшін өсімдіктен жасалған дәрілерді пайдаланады. Дәстүрлі медицинада дәрілік өсімдіктердің кең таралғанына қарамастан, олардың кейбіреулері ғана оның тиімділігі мен қауіпсіздігіне тексерілген [8-10]. Осы себепке байланысты соңғы бірнеше жылда дәрілік өсімдіктердің, олардың сығындыларының, сондай-ақ өсімдіктердің биологиялық белсенді заттарының токсикологиялық және фармакологиялық профилін зерттеудің саны күрт өсті [11].

Жалпы уыттылық қасиеттерін зерттеу дәрілік заттардың барлық топтары үшін міндетті болып табылады және екі кезеңге бөлінеді: жедел уыттылықты зерттеу (бір дозада немесе көп реттік дозада 24-48 сағаттан аспайтын уақытта енгізілген заттардың токсикалық әсері физиологиялық функциялардың бұзылуында немесе тәжірибелік жануарлардың мүшелерінің морфологиясының бұзылуында, сондай-ақ жануардың өлімімен байқалады); ал, созылмалы уыттылықты зерттеу-тәжірибелік жануарлардың

ағзалары мен жүйелерінің функционалдық және морфологиялық бұзылыстарының жиынтығы, затты қайталап ұзақ уақыт енгізу арқылы анықталады. Осыған байланысты, қауіпсіз пероральді дозаны анықтау үшін уыттылық сынақтары қажет [12].

Polygonaceae тұқымдасына жататын өсімдіктер антрахинондар, нафтахинондар, стилбендер, стероидтар, флавоноидты гликозидтер, лейкоантоцианидиндер, фенол қышқылдары сияқты биологиялық маңызды екінші реттік метаболиттерді көп мөлшерде түзетіні белгілі [13].

Бұл зерттеудің мақсаты – қазақстандық дәрілік өсімдік *R. tianschanicus* L. сығындысынан алынған биологиялық белсенді кешендерінің қасиеттерін клиникаға дейінгі созылмалы уыттылық тәжірибесінде зерттеу.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Тянь-Шань қымыздығы өсімдігінің шикізаты, тамырлары мен тамырсабақтары 2021 жылдың маусым айында Алматы облысы Талғар ауданы, Ой-Қарағай шатқалындағы табиғи өсу орындарынан жиналды.

Өсімдік шикізатындағы антрагликозидтер негізіндегі биологиялық белсенді кешен біз әзірлеген әдіс бойынша алынды: *Rumex tianschanicus* L. тамыры мен тамырсабақтары ауалы-көлеңке әдісімен кептірілді, 3-7 мм

бөлшектердің өлшеміне дейін ұсақталған, тазартылған су құйылған, рН 8,5 дейін сілтіленген, натрий гидрокарбонатының қаныққан ерітіндісімен, көлемі бойынша 1:8 қатынасында, Непан MCR-3 микротолқынды экстракторына жүктелген, экстракция 600 Вт микротолқынды пеште 4 минут бойы жүргізілді.

Алынған сығынды сүзілді, ІКА RV10 айналмалы буландырғышында 400С температурада ең аз көлемге дейін концентрленді. Алынған қою сығындыға көлем бойынша 1:1 қатынасында магний ацетатының 20% спирттік ерітіндісі қосылды. Антрагликозидтер қосындысының тұндыру процесі 0°С температурада 2 сағат бойы жүргізілді. Антрахинон тұздарының тұнбасын центрифугалау (1500 айн/мин), содан кейін декантация және кептіру арқылы ерітіндіден бөлді.

Антрагликозидтер негізінде алынған фитокмплекстің түпнұсқалығы фитохимиялық талдаудың ресми және дәстүрлі әдістерімен бақыланды [14,15], стандарттау ӨЖСХ (HPLC) арқылы Spherisorb ODS-1 колонкасында, ацетонитрил-судың 65:35 элюент жүйесін пайдалана отырып және түпнұсқа үлгілерді пайдаланып 254 нм УК анықтау арқылы жүргізілді [16].

Созылмалы уыттылықты зерттеу *тәжірибесінде* салмағы 200-250 г болатын 36 ақ тұқымды зертханалық аталық егеуқұйрықтар пайдаланылды. Жануарлар жынысына сәйкес 6 топтан (4 тәжірибелік және 2 бақылау) бөлек торларда ұсталды. Виварий бөлмелеріндегі ауа ылғалдылығы 60-70%, ал температурасы 18-20°С диапазонында сақталды. Жануарлар виварий диетасының стандартты жағдайында ұсталды. Тәжірибе топтарының жануарларына *Rumex tianschanicus* L. сығындысы әртүрлі дозада, яғни 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг 21 күн бойы *per os* берілді. Ал, бақылау тобының жануарлары инъекцияға арналған су қабылдады және интакт топ болды. Уытты әсерді бағалау үшін жануарлардың жалпы жағдайы, мінезқұлық реакциялары, тамақ пен су қабылдауы ескерілді. Созылмалы уыттылық эксперименті аяқталғаннан кейін жануарларды ұйықтатып, гематологиялық және биохимиялық қан анализі үшін перифериялық қан үлгілері алынды.

Сонымен қатар, зертханалық жануарлардың іштерін ашып, асқазанның, бауырдың, бүйректің, жүректің, ұйқы безі құрылымындарының макроморфологиялық өзгерістерді бағаланды. Содан кейін материал 10% формальдегид ерітіндісіне бекітілді.

Гематологиялық зерттеулер Sysmex XS 550-i (Жапония) автоматты гематологиялық ана-

лизаторында жүргізілді. Зерттеу нәтижелері BioChem-200 автоматты биохимиялық анализаторына жазылды.

Топтық айырмашылықтардың статистикалық маңыздылығы Стьюденттің t-критерийі көмегімен анықталды, оның сенімділігі $p \leq 0,05$ болды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Rumex tianschanicus L. сығындысын өнімділігі жоғары сұйықты хроматография ӨЖСХ әдісімен талдауың нәтижесінде оның құрамы анықталды: 84,9% антрахинон гликозидтері, 14,7% антрахинон агликондары, 0,4% нафтахинондар. Бұл компоненттер асқазан-ішек жолдары, бауыр, іш қату, диарея және тері ауруларында белсенді метаболиттер ретінде әсер ете алады [1, 2].

Қан түзу жүйесі улы қосылыстардың әсеріне өте сезімтал келеді [17, 18]. Сондықтан өсімдік сығындыларының жануардың қан жүйесіне әсерін анықтау үшін гематологиялық көрсеткіштерді бағалау аса маңызды [19, 20]. Осыған байланысты созылмалы уыттылық тәжірибесіндегі *Rumex tianschanicus* L. сығындысын әртүрлі мөлшерде қабылдайтын егеуқұйрықтардың гематологиялық көрсеткіштерін зерттеу кезінде (нәтижелері 1-кестеде көрсетілген) интакт, бақылау топтарының егеуқұйрықтарымен салыстырғанда, эритроциттердің жалпы саны, гемоглобин деңгейі, нейтрофилдердің, моноциттердің, эозинофилдердің және базофилдердің абсолютті және салыстырмалы құрамы статистикалық өзгерген жоқ ($p \leq 0,05$). Ал, лейкоциттердің жалпы санының көрсеткіштері бойынша сығындыны 50 мг/кг және 100 мг/кг қабылдайтын топтағылар мен интактты топ арасында айтарлықтай статистикалық өзгерістер ($p \leq 0,05$) болды.

Тромбоциттердің жалпы саны бойынша созылмалы уыттылықтың барлық топтарында интакт және бақылау топтарына қатысты нақты айырмашылықтар ($p \leq 0,05$) шықты. Ол айырмашылықтар: *Rumex tianschanicus* L. сығындысын 10 мг/кг қабылдайтын топта- $390,9 \pm 22,7^*$, 25 мг/кг қабылдайтын топта- $372,0 \pm 15,8^{**}$, 50 мг/кг қабылдайтын топта- $381,8 \pm 18,3^*$ және 100 мг/кг қабылдайтын топта- $376,0 \pm 19,6^{**}$ болды.

1-кестеге сәйкес лимфоциттердің абсолютті құрамы бойынша интакт және бақылау топтарымен салыстырғанда *Rumex tianschanicus* сығындысын қабылдайтын созылмалы уыттылықтың барлық топтарында статистикалық маңызды айырмашылықтар ($p \leq 0,05$) шықты. Ол айырмашылықтар: *Rumex*

tianschanicus сығындысын 10 мг/кг қабылдайтын топта- $3,8 \pm 0,05^*$, 25 мг/кг қабылдайтын топта- $4,33 \pm 0,39^{**}$, 50 мг/кг қабылдайтын топта- $4,11 \pm 0,2^{**}$ және 100 мг/кг қабылдайтын топта- $4,2 \pm 0,7^{**}$ болды.

Алынған мәліметтерді талдау нәтижелері тәжірибелік жануарлардағы қанның негізгі көрсеткіштері физиологиялық нормадан аспайды деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді (1-кесте).

1-кесте – Созылмалы уыттылық тәжірибесіндегі егеуқұйрықтардың гематологиялық көрсеткіштері

Көрсеткіштің аты, өлшем бірлігі	MC	Интакт	Бақылау (инъекцияға арналған су)	<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 10 мг/кг	<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 25 мг/кг	<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 50 мг/кг	<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 100 мг/кг
Лейкоциттердің жалпы саны 10^9 /л	WBC	$6,3 \pm 0,02$	$6,5 \pm 0,05$	$7,2 \pm 0,9$	$6,7 \pm 0,7$	$7,3 \pm 0,6^*$	$7,4 \pm 0,4^*$
Эритроциттердің жалпы саны 10^{12} /л	RBC	$6,3 \pm 0,08$	$6,1 \pm 0,07$	$7,1 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,6$	$7,1 \pm 0,5$
Гемоглобин деңгейі, г/л	HGB	$138,0 \pm 4,7$	$136,5 \pm 5,2$	$142,0 \pm 5,8$	$145,2 \pm 4,3$	$136,5 \pm 4,5$	$140,0 \pm 4,8$
Тромбоциттердің жалпы саны, 10^9 /л	PLT	$410,5 \pm 23,0$	$397,6 \pm 17,5$	$390,9 \pm 22,7^*$	$372,0 \pm 5,8^{**}$	$381,8 \pm 18,3^*$	$376,0 \pm 19,6^{**}$
Нейтрофилдердің абсолютті құрамы, 10^9 /л	Neut	$5,7 \pm 0,04$	$5,2 \pm 0,09$	$4,7 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,05$	$5,5 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,06$
Лимфоциттердің абсолютті құрамы, 10^9 /л	Lymph	$2,5 \pm 0,01$	$2,9 \pm 0,08$	$3,8 \pm 0,05^*$	$4,33 \pm 0,39^{**}$	$4,11 \pm 0,2^{**}$	$4,2 \pm 0,7^{**}$
Моноциттердің абсолютті құрамы, 10^9 /л	Mono	$0,5 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,5$
Эозинофилдердің абсолютті құрамы, 10^9 /л	Eos	$0,2 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,01$
Базофилдердің абсолютті құрамы, 10^9 /л	Baso	$0,03 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,005$	$0,01 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,003$	$0,02 \pm 0,001$	$0,03 \pm 0,002$
Нейтрофилдердің салыстырмалы құрамы, %	Neut	$49,0 \pm 3,6$	$46,2 \pm 7,4$	$45,5 \pm 7,4$	$43,8 \pm 8,6$	$43,75 \pm 5,6$	$42,7 \pm 7,3$
Лимфоциттердің салыстырмалы құрамы, %	Lymph	$43,4 \pm 2,3$	$44,5 \pm 3,9$	$46,2 \pm 6,5$	$49,2 \pm 3,2$	$48,45 \pm 8,6$	$50,1 \pm 6,4$
Моноциттердің салыстырмалы құрамы, %	Mono	$6,8 \pm 0,9$	$5,5 \pm 0,8$	$5,7 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,9$	$6,3 \pm 0,9$
Эозинофилдердің салыстырмалы құрамы, %	Eos	$2,6 \pm 0,09$	$2,55 \pm 0,01$	$1,6 \pm 0,01$	$1,7 \pm 0,09$	$2,0 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,015$
Базофилдердің салыстырмалы құрамы, %	Baso	$0,2 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,09$	$0,15 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,09$
Ескерту: * – интакт тобына қатысты статистикалық маңызды өзгерістер ($p \leq 0,05$). ** – екінші топқа қатысты статистикалық маңызды өзгерістер ($p \leq 0,05$).							

Биохимиялық талдаулар бойынша созылмалы уыттылық тәжірибесіндегі жануарлардың билирубин және оның фракциялары, трансаминазалар деңгейінің көрсеткіштерінің зерттеу нәтижелері 2-кестеде көрсетілген. Бауыр химиялық заттардың жойылуында маңызды рөл атқарады және осы агенттердің уыттылығына сезімтал. Бауыр функциясы мен бауырдың тұтастығын тексеру қан сарысуындағы АлТ, АсТ, билирубин деңгейлерін бағалауды біріктіреді. Бауырдың қазіргі күйін бағалау үшін жиі қолданылатын жалпы көрсеткіштерге АлТ және АсТ кіреді [21, 22]. Осыған байланысты, *Rumex tianschanicus* L. сығындысын 50 мг/кг және 100 мг/кг қабылдайтын топтарда АсТ белсенділігі жоғарылады ($p \leq 0,05$). Бұл нәтиже интакт, бақылау, *Rumex tianschanicus* L. сығындысын 10 мг/кг және 25 мг/кг қабылдайтын топтарға қатысты енгізілді. АсТ белсенділігінің жоғарылауы паренхима жасушаларында және жүрек бұлшықетіндегі өзгерістерді көрсетуі мүмкін.

Сонымен қатар, бауырдың холестатикалық ауруын анықтауда сілтілі фосфатазаның рөлі аса маңызды [23]. Интакт және бақылау топтарымен салыстырғанда *Rumex tianschanicus* L. сығындысын 25 мг/кг, 50 мг/кг және 100 мг/кг қабылдайтын созылмалы уыттылық топтарында сілтілі фосфатаза мәндерінің жоғарылауы ($p \leq 0,05$) анықталды. Осы өзгерістерге байла-

нысты әртүрлі сығынды алған топтардың өт жолдарында қабылдаған мөлшерге байланысты физиологиялық норма шегіндегі өзгерістер болды.

Rumex tianschanicus L. сығындысын қабылдайтын 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг және 100 мг/кг тәжірибелік топтарда интакт және бақылау топтарымен салыстырғанда зәр қышқылы көрсеткіші айтарлықтай төмендеді ($p \leq 0,05$). Бұл нәтиже *Rumex tianschanicus* L. сығындысындағы биологиялық белсенді кешендердің зәр шығару жүйесі мүшелеріне теріс әсерінің жоқтығын нақты көрсетеді.

Мочевина және креатинин метаболизмнің азотты соңғы өнімдері болып табылады. Мочевина тағамдық немесе ұлпа ақуызының алмасуы кезінде пайда болады. Ал, бұлшықет креатинині ыдырағанда креатинин түзіледі. Мочевина және креатинин талдауы – бүйрек қызметін бағалау үшін қолданылатын скринингтік сынақтар. Сондықтан сарысудағы креатинин мен мочевина деңгейінің жоғарылауы бүйрек функциясының ықтимал бұзылуының көрсеткіші болып табылады [24, 25]. Ал, біздің зерттеуде мочевина және креатинин биохимиялық көрсеткіштердің нәтижелері тәжірибелік жануарларда айқын жоқ, демек бұл *Rumex tianschanicus* L. сығындысын ұзақ уақыт енгізу кезінде зат алмасу бұзылыстарының жоқтығын көрсетеді (Кесте 2).

2-кесте – Созылмалы уыттылық тәжірибесіндегі жануарлардың билирубинінің және оның фракцияларының, трансаминазалар деңгейінің көрсеткіштері.

Жануарлар тобы	Жалпы билирубин, ммоль/л	АлТ, МЕ/л	АсТ, МЕ/л	СФ, МЕ/л	Мочевина, ммоль/л	Зәр қышқылы, ммоль/л	Креатинин, мкмоль/л
Интакт	0,9±0,4	22,0±3,6	11,4±2,0	316,4±12,49	3,9±0,5	340,80±35,9	54,0±3,6
Бақылау (инъекцияға арналған су)	0,8±0,2	23,0±3,5	10,8±4,9	318,0±64,9	3,7±0,3	335,8±36,8	53,8±4,5
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 10 мг/кг	0,9±0,3	24,0±2,3	11,8±5,9	220,4±37,1	4,1±0,5	316,9±34,8*/**	51,2±4,3
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 25 мг/кг	1,3±0,6	25,3±2,5	10,8±0,73	239,2±17,3*/**	4,0±0,8	311,5±25,5*/**	52,3±4,7
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 50 мг/кг	1,2±0,4	26, 0±3,3	31,2±4,0* /**/****	241,7±10,4 */**	4,4±1,0	314,5±27,5*/**	55,3±5,7
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 100 мг/кг	1,6±0,2	26, 5±3,5	33,4±4,1* /**/****	245,6±10,8 */**	4,5±1,2	320,5±31,5*/**	56,3±5,9
Ескерту: * – интакт топқа қатысты статистикалық маңызды айырмашылықтар, $p \leq 0,05$ кезінде; **- бақылау тобына қатысты статистикалық маңызды айырмашылықтар (инъекцияға арналған су), $p \leq 0,05$ кезінде; ***- 10 мг/кг тобына қатысты статистикалық маңызды айырмашылықтар, $p \leq 0,05$ кезінде; **** – 25 мг/кг тобына қатысты статистикалық маңызды айырмашылықтар.							

3-кесте көрсетілген созылмалы уыттылық тәжірибесі топтарындағы (*Rumex tianschanicus* L. сығындысын 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг және 100 мг/кг қабылдайтын) жануарлардың липидтер алмасуының нәтижелері бойынша триглицеридтер, жалпы холестерин, ЛПВП холестерині,

ЛПНП холестерині және атерогендік коэффициент бойынша статистикалық маңызды айырмашылықтар ($p \leq 0,05$) болған жоқ. Сәйкесінше, липидтер алмасуының көрсеткіштерінің нәтижелері физиологиялық нормада болды (Кесте 3).

3-кесте – Жануарлардың тәжірибелік топтарындағы липидтер алмасуының көрсеткіштері

Жануарлар тобы	Триглицеридтер, ммоль/л	Жалпы холестерин, ммоль/л	ЛПВП холестерині, ммоль/л	ЛПНП холестерині, ммоль/л	Атерогендік коэффициент
Интакт	0,8 ± 0,02	1,6 ± 0,03	1,0 ± 0,02	1,0 ± 0,02	0,7 ± 0,02
Бақылау (инъекцияға арналған су)	0,6 ± 0,05	1,8 ± 0,04	0,9 ± 0,01	0,9 ± 0,04	0,6 ± 0,3
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 10 мг/кг	0,9 ± 0,03	1,9 ± 0,05	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,04
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 25 мг/кг	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,06	1,2 ± 0,03	1,3 ± 0,05	0,9 ± 0,05
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 50 мг/кг	1,0 ± 0,6	1,8 ± 0,07	1,3 ± 0,04	1,4 ± 0,05	0,7 ± 0,06
<i>Rumex tianschanicus</i> L. сығындысы 100 мг/кг	1,2 ± 0,07	2,0 ± 0,09	1,4 ± 0,05	1,5 ± 0,6	0,8 ± 0,07
Ескерту: * – интакт топқа қатысты статистикалық маңызды айырмашылықтар, $p \leq 0,05$;					

Зерттеуіміздің нәтижелері билирубин деңгейінің гематологиялық, биохимиялық көрсеткіштері және оның фракцияларының, сондай-ақ липидтік алмасу көрсеткіштерінің негізінде *in vivo* жағдайындағы *Rumex tianschanicus* L. сығындысының құрамындағы биологиялық белсенді кешендердің айқын уытты қасиеттерінің жоқ екендігін көрсетеді.

Қорытынды

Біздің зерттеулердің нәтижесі бойынша *Rumex tianschanicus* L. сығындысын егеуқұйрықтарға әртүрлі дозаларда (10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг және 100 мг/кг) *per os* енгізгенде жануарлардың тірі қалу деңгейі 100% көрсетті. Сығынды асқазан-ішек жолдарына және бауырдың функцияларына тікелей әсер еткен жоқ, бұл егеуқұйрықтардағы гематологиялық және биохимиялық қан анализінің нәтижелерімен расталады. Сонымен қатар, сығындыны қабылдаған созылмалы уыттылық топтарындағы жануар-

ларда тағамды қабылдауда, су қабылдауда және дене салмағында ешқандай өзгерістер болған жоқ. Сондай-ақ, визуалды тексеру кезінде егеуқұйрықтардың органдардың макроқұрылымында айқын өзгерістердің жоқтығын байқадық. Сондықтан *Rumex tianschanicus* L. сығындысының құрамындағы биологиялық белсенді кешендердің ішке қабылдағанда қауіпсіз екендігі дәлелденді және терапиялық қолдануға арналған дәрілік зат ретінде зерттелуі керек.

Қаржыландыру көзі

Зерттеу жұмысы Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым Комитетінің МҚБ (ПЦФ) бағдарламасына сәйкес жүргізілді (NoOR11465435). «Организмдерді мутагендік әсерден қорғау, табиғи ресурстардың өнімділігін арттыру және халықтың өмір сүру сапасын жақсарту үшін жаңа геномдық технологияларды әзірлеу және қолдану» 2021-2022 жж..

Әдебиеттер

- 1 Shokan A.K., Ginayatova I.B., Yergozova D.M., Kudrina N.O., Korulkin D.Y., Terletskaia N.V., Korbozova N.K. Effects of *Rumex tianschanicus* Losinsk extract on hematological indicators in experimental gastritis // Journal «Bulletin of Karagandy University». – 2021. Vol. 3 (103). – P. 150-156.
- 2 Vasas A., Orbán-Gyapai O., Hohmann J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology // J Ethnopharmacol. – 2015. – Volume 175. – P. 198-228.
- 3 Kharchoufa L., Merrouni I.A., Yamani A., Elachouri M. Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco // Toxicity concerns. – 2018. – Toxicon Volume 154. – P. 90-113.
- 4 Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Ганопольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15. – № 2. – С. 56–63.
- 5 World Health Organization. WHO Launches the First Global Strategy on Traditional and Alternative Medicine (2002). <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/release38/en/>.
- 6 Bae JW., Kim DH., Lee WW., Kim HY., Son CG. Characterizing the human equivalent dose of herbal medicines in animal toxicity studies // Ethnopharmacol. – 2015. – V. 162. – P. 1-6.
- 7 Anandika, S., Vikas, G., Saxena, A.M., Dharamveer, P., Sanjay, K. Evaluation of the Anti-diabetic Potential of *Rumex vesicarius* L. In normal and Streptozotocin induced Diabetic Rats // Research Journal of Biotechnology. – 2022. – Vol. 17(4). – P. 663-667.
- 8 Costa C., Tsatsakis A., Mamoulakis C., Teodoro M., Briguglio G., Caruso E., Tsoukas D., Margina D., Dardiotis E., Kouretas D., Fenga C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases // Food Chem. Toxicol. – 2017. – Vol. 110. – P. 286-299.
- 9 Park Mee-Yeon, Choi Hae-Yun, Kim Jong-Dae, Lee Hyeung-Sik, Ku Sae-Kwang. 28 days repeated oral dose toxicity test of aqueous extracts of mahwangyounpaе-tang, a polyherbal formula // Food and Chemical Toxicology. – 2010. – Vol. 48 (9). – P. 2477-2482.
- 10 Dicson S. M., Samuthirapandi M., Govindaraju A., Kasi P.D. Evaluation of in vitro and in vivo safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia* // Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2015. – Vol. 73 (1). – P. 241-247.
- 11 Awobajo F. O., Omorodion-Osagie E., Olatunji-Bello I. I., Adegoke O. A., Adeleke T.L. Acute oral toxicity test and phytochemistry of some West African medicinal plants // Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine. – 2009. – Vol. 19(1). – P. 53-68.
- 12 Amutha, M., Geetha, A., Amuth, M. A pilot study on the determination of antioxidant potential and lethal dosage of hydro alcoholic fruit extract of *Terminalia Chebula* // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 6(6). – P. 346-351.
- 13 Purohit M.C., Navneet S., Goutam K., Rashmi R., Mahender S. Investigation of in vitro antioxidant potential of methanolic extract of bark of *Prunus cornuta* and root of *Rumex obtusifolius* // Plant Archives. – 2021. – Vol. 21(1). – P. 73-77.
- 14 Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Алматы: Жибек жолы, 2008. – Т. 1. – С. 592–609.
- 15 Музычкина Р.А., Королькин Д.Ю. Биологически активные вещества растений. Выделение, разделение, анализ. – Алматы: Атамұра, 2006. – 438 с.
- 16 Derksen G.C.H., Van Beek T.A. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycosides and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.) // J.Chromatogr. A. – 1998. – Vol. 816. – P. 277-281.
- 17 Mukinda J.T., Syce J.A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents // Journal Ethnopharmacol. – 2007. – Vol. 112(1). – P. 138–144.
- 18 Maxwell I. Ezeja, Aruh O. Anaga, Isaac U. Asuzu. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Volume 151. – Issue 3. – P. 1155-1164.
- 19 Yakubu M. T., Akanji M. A., Oladiji A.T. Hematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem // Pharmacogn Mag. – 2007. – Vol. 3(9). – P. 34-41.
- 20 Yakubu M. T., Akanji M. A., and Oladiji A. T. Aphrodisiac potentials of aqueous extract of *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Hiern) stem in male albino rats // Asian J. Androl. – 2005. – Vol. 7(4). – P. 399-404.
- 21 Bamikunle M. O., Zezi A. U., Ya'u J. Effect of methanol root extract of *Eriosema psoraleoides* on biochemical and haematological parameters and cyclooxygenase levels in rats // Journal of Ethnopharmacology. – 2022. – Vol. 295. – P. 115434.
- 22 Ng'uni T., Klaasen J. A., Fielding B. C. Acute toxicity studies of the South African medicinal plant *Galenia africana* // Toxicology Reports. – 2018. – Vol. 5. – P. 813-818.
- 23 Chen K. L., Bi K. S., Han F., Zhu H. Y., Zhang X. S., Mao X. J., Yin R. Evaluation of the protective effect of Zhi-Zi-da-Huang decoction on acute liver injury with cholestasis induced by α -naphthylisothiocyanate in rats // Journal of Ethnopharmacology. – 2015. – Vol. 172. – P. 402-409.
- 24 Solter P., Liu Z., Guzman R. Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2000. – Vol. 164 (2). – P. 216–20.
- 25 Рахманин Ю.А., Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Коганова З.И., Князева Т.Д., Железняк Е.В. и др. (2014) Сравнительный анализ влияния нано- и ионной форм серебра на биохимические показатели лабораторных животных // Гигиена и санитария. – 2014. – Vol. 1. – P. 45–50.

References

- 1 Amutha, M., Geetha, A., Amuth, M. (2014) A pilot study on the determination of antioxidant potential and lethal dosage of hydro alcoholic fruit extract of *Terminalia Chebula*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*, vol. 6(6), pp. 346-351
- 2 Anandika, S., Vikas, G., Saxena, A.M., Dharamveer, P., Sanjay, K. (2022). Evaluation of the Anti-diabetic Potential of *Rumex vesicarius* L. In normal and Streptozotocin induced Diabetic Rats. *Research Journal of Biotechnology.*, vol. 17(4), pp. 63-667.
- 3 Awobajo F. O., Omorodion-Osagie E., Olatunji-Bello I. I., Adegoke O. A., Adeleke T.L. Acute oral toxicity test and phytochemistry of some West African medicinal plants // *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*. – 2009. – Vol. 19(1). – P. 53-68.
- 4 Bae JW., Kim DH., Lee WW., Kim HY., Son CG. (2015) Characterizing the human equivalent dose of herbal medicines in animal toxicity studies. *Ethnopharmacol.*, vol. 162, pp. 1-6.
- 5 Bamikunle M. O., Zezi A. U., Ya'u J., (2022) Effect of methanol root extract of *Eriosema psoraleoides* on biochemical and haematological parameters and cyclooxygenase levels in rats. *Journal of Ethnopharmacology.*, vol. 295, pp. 115434.
- 6 Chen K. L., Bi K. S., Han F., Zhu H. Y., Zhang X. S., Mao X. J., Yin R., (2015) Evaluation of the protective effect of Zhi-Zi-da-Huang decoction on acute liver injury with cholestasis induced by α -naphthylisothiocyanate in rats. *Journal of Ethnopharmacology.*, vol. 172, pp. 402-409.
- 7 Costa C., Tsatsakis A., Mamoulakis C., Teodoro M., Briguglio G., Caruso E., Tsoukas D., Margina D., Dardiotis E., Kouretas D., Fenga C. (2017) Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food Chem. Toxicol.*, vol. 110, pp. 286-299.
- 8 Derksen G.C.H., Van Beek T.A. (1998) High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glycosides and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.). *J.Chromatogr. A.*, vol. 816, pp. 277-281.
- 9 Dicson S. M., Samuthirapandi M., Govindaraju A., Kasi P.D., (2015) Evaluation of in vitro and in vivo safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*, vol. 73 (1), pp. 241-247.
- 10 Gosudarstvennaya farmakopeya Respubliki Kazakhstan.-Almaty: Zhibek zholy, 2008. – T. 1. – S. 592–609.
- 11 Kharchoufa L., Merrouni I.A., Yamani A., Elachouri M. (2018). Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: Toxicity concerns. *Toxicol.*, vol. 154, pp. 90-113.
- 12 Maxwell I. Ezeja, Aruh O. Anaga, Isaac U. Asuzu. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. – Volume 151. – Issue 3. – P. 1155-1164.
- 13 Muzychkina R.A., Korulkin D.Yu. *Biologicheski aktivnye veshstva rastenii. Vydelenie, razdelenie, analiz.* – Almaty: Atamura, 2006. – s. 438.
- 14 Mukinda J.T., Syce J.A., (2007) Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal Ethnopharmacol.*, vol. 112(1), pp. 138–44.
- 15 Ng'uni T., Klaasen J. A., Fielding B. C., (2018) Acute toxicity studies of the South African medicinal plant *Galenia africana*. *Toxicology Reports*, vol. 5, pp. 813-818.
- 16 Park Mee-Yeon, Choi Hae-Yun, Kim Jong-Dae, Lee Hyeung-Sik, Ku Sae-Kwang (2010). 28 days repeated oral dose toxicity test of aqueous extracts of mahwangyounpae-tang, a polyherbal formula. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48 (9), pp. 2477-2482.
- 17 Purohit M.C., Navneet S., Goutam K., Rashmi R., Mahender S. (2021) Investigation of in vitro antioxidant potential of methanolic extract of bark of *prunus cornuta* and root of *Rumex obtusifolius*. *Plant Archives*, vol. 21(1), pp. 73-77.
- 18 Rahmanin İ.U.A., Hripach L.V., Mihailova R.İ., Koganova Z.İ., Knäzeva T.D., Jeleznák E.V. i dr. (2014) Srovnatelný analýza vlivu nano- a ionnoho tvaru na biochemické ukazatele laboratorních zvířat. *Gigiena i sanitaria*, vol. 1, pp. 45–50.
- 19 Sambukova T.V., Ovchinnikov B.V., Ganapolskii V.P., Yatmanov A.N., Shabanov P.D. (2017) Perspektivy ispolzovaniya fitopreparatov v sovremennoi farmacologii. *Obzory po klinicheskoi farmacologii i lekarstvennoi terapii*, vol. 15. Issue 2, pp. 56–63.
- 20 Shokan A.K., Ginayatova I.B., Yergozova D.M., Kudrina N.O., Korulkin D.Y., Terletskaya N.V, Korbozova N.K. (2021) Effects of *Rumex tianschanicus* Losinsk extract on hematological indicators in experimental gastritis. *Journal «Bulletin of Karagandy University*, vol. 3 (103), pp. 150-156.
- 21 Solter P., Liu Z., Guzman R., (2000) Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 164 (2), pp. 216–20.
- 22 Vasas A., Orbán-Gyapai O., Hohmann J. (2015) The Genus *Rumex*. Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology, vol. 175, pp. 198-228.
- 23 World Health Organization Launches the First Global Strategy on Traditional and Alternative Medicine (2002) <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/release38/en/>.
- 24 Yakubu M. T., Akanji M. A., Oladiji A.T., (2007) Hematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. *Pharmacogn Mag.*, vol. 3(9), pp. 34-41.
- 25 Yakubu M. T., Akanji M. A., and Oladiji A. T., (2005) Aphrodisiac potentials of aqueous extract of *Fadogia agrestis* (Schweinf. Ex Hiern) stem in male albino rats. *Asian J. Androl.*, vol. 7(4), pp. 399-404.

МАЗМҰНЫ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

Шолу мақаласы	Review articles	Обзорная статья
<i>A.K. Shametov</i> The impacts of heavy metals on the gut microbiome in common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)		4
1-бөлім Ботаника	Section 1 Botany	Раздел 1 Ботаника
<i>A.T. Aitbayeva, T.Ye. Aitbayev, Zh.Zh. Mamyrbekov, B.D. Zorzhonov, M.Zh. Koshmagambetova</i> The influence of organic and biological fertilizers on growth processes, productivity and quality of melon fruits in the south-east of Kazakhstan		12
<i>T.A. Вдовина, О.А. Лагус</i> Хозяйственно-интродукционная оценка сортов и форм черемухи <i>Padus</i> Mill. в Алтайском ботаническом саду		22
2-бөлім Биотехнология	Section 2 Biotechnology	Раздел 2 Биотехнология
<i>A.A. Жұбанова, Г.Ж. Абдиева, П.С. Уалиева, А.М. Мәлік</i> Сүт сарысуының микробтық қауымдастығының микробиологиялық көрсеткіштері және таксономиялық құрамын зерттеу		36
<i>Г.Қ. Қамшыбаева, Б.Д. Қосалбаев, А.К. Садвакасова, Б.К. Заядан</i> <i>Anabaena</i> цианобактериялық түрлерінің сутегі өндірісінің болашағы мен мәселелері		55
<i>S.S. Kassymbekova, T.A. Bukeyeva, I.E. Bishimova, S.G. Murzageldinova, I.S. Korotetskiy</i> Differential cytokine response of immunocompetent cells to the induction of resistant, revertant and sensitive <i>Escherichia coli</i>		75
4-бөлім Молекулалық биология және генетика	Section 4 Molecular biology and genetics	Раздел 4 Молекулярная биология и генетика
<i>Ж.К. Жунусбаева, Н.Ж. Омирбекова, Б.О. Бекманов, Д.О. Мынбаева, М.Е. Естаева, А.Е. Ержан, А.Б. Рысбекова, А.И. Жусупова, Ш.М. Ыргынбаева</i> Определение носителей генов устойчивости к листовой ржавчине с использованием молекулярно-генетического анализа в сортах мягкой и твердой пшеницы		88
<i>D.K. Kamalova, M.Zh. Zhurinov, G.A. Tasanova, A.O. Amirgazin, K.K. Mukanov, A.B. Shevtsov</i> Development of a protocol for whole genome sequencing of the SARS-COV-2 virus		101
<i>В.А. Кузовлев, Э.О. Абайлдаев, А.А. Хакимжанов</i> Активность и компонентный состав защитных белков в зерне и проростках пшеницы, ячменя и овса		109
<i>A.S. Nizkorodova, E.R. Maltseva, D.A. Naizabayeva, Yu.A. Skiba, A.M. Alexandrova, R.M. Nargilova</i> Universal primers and fluorescent probe detect reference 18s rRNA gene in all vertebrates.....		121

6-бөлім Зоология	Section 6 Zoology	Раздел 6 Зоология
<i>A.S. Assylbekova, G.K. Barinova, G.A. Aubakirova, A.B. Makhanbetova, Zh.B. Kuanchaleyev, S.E. Mussin, A.D. Mussina</i> Cryopreservation of reproductive cells of male russian sturgeon.....		132
<i>Б.І. Барбол, Н.Н. Попов, А.М. Абдыбекова</i> Структура популяции морского судака (<i>Sander marinus cuvier</i> , 1828) в Мангистауском побережье Среднего Каспия.....		139
<i>У.Т. Жуматаева, Б.А. Дүйсембеков</i> Азиялық шегіртке дернәсілдерінің сан мөлшерін тиімді төмендету үшін инокулюмнің оңтайлы концентрациясын таңдау		148
<i>E.G. Krupa, M.O. Aubakirova, S.M. Romanova</i> Seasonal dynamics of environmental variables and zooplankton structure in wastewater reservoirs of the right-bank sorbulak canal system		159
7-бөлім Адам және жануарлар физиологиясы	Section 7 Human and animal physiology	Раздел 7 Физиология человека и животных
<i>А.Қ. Шоқан, Н.О. Кудрина, Д.Ю. Коренькин, Н.В. Терлецкая, Т.Е. Кулманов</i> <i>Rumex tianschanicus L.</i> негізіндегі биологиялық белсенді кешендердің қасиеттерін созылмалы уыттылық тәжірибесінде зерттеу		180