

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

---

№2 (87)

Алматы  
“Қазақ университеті”  
2021



ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

# ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №2 (87) маусым



04. 05. 2017 ж. Қазақстан Республикасының Ақпарат және коммуникация министрлігінде тіркелген

Қуәлік № 16494-Ж

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

## ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Сапарғалиева Н.С., б.ғ.к., аға оқытушы (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)  
**Ивашенко А.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Мухитдинов Н.М.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Нургазин С.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)  
**Турусбеков Е.К.**, б.ғ.к., қауымдастырылған профессор (Қазақстан)

**Омаров Р.Т.**, PhD (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)

## ТЕХНИКАЛЫҚ ХАТШЫ

Смекенов 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.



## Жоба менеджері

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

## Редакторлары:

Гульмира Бекбердиева  
Агила Хасанқызы

## Компьютерде беттеген

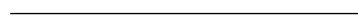
Айгүл Алдашева

ИБ № 14650

Пішімі 60x84 <sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Көлемі 11,4 б.т. Тапсырыс № 6236.  
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, 2021

**ШОЛУ МАҚАЛАСЫ**



**REVIEW ARTICLES**



**ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ**

**S.S. Bakiyev\*** , **A.K. Bissenbaev** 

NCJSC “Al-Farabi Kazakh National University”, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: [serik\\_2595@mail.ru](mailto:serik_2595@mail.ru)

## DISEASES CAUSED BY BACTERIA OF THE *AEROMONAS* AND *PSEUDOMONAS* GENUS WHEN REARED FISH IN CONTROLLED SYSTEMS

Aquaculture represents a higher share of world fish supply and a strong influence on price formation in the sector overall (both production and trade). The total sale value of fisheries and aquaculture production in 2016 was estimated at USD 362 billion, of which USD 232 billion was from aquaculture production. Between 1961 and 2016, the average annual increase in global food fish consumption (3.2 percent) outpaced population growth (1.6 percent) and exceeded that of meat from all terrestrial animals combined (2.8 percent). By creating optimal growing conditions such as temperature, oxygen and hydrochemical regimes, the growth and sexual maturation of fish is significantly reduced, which contributes to the development of industrial aquaculture. However, the rapid development of aquaculture is accompanied by outbreaks of diseases caused by bacterial infection, which lead to high mortality and catastrophic economic losses. Mass outbreaks can occur suddenly under the influence of stress factors arising in connection with a sharp change in conditions of detention, as well as an increase in planting densities of rearing objects. The most severe bacterial diseases in aquaculture are infections caused by members of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus. Bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus are the causative agents of hemorrhagic septicemia (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*), furunculosis (*Aeromonas salmonicida*), which annually cause economic losses in aquaculture. Nowadays, due to widespread and often uncontrolled use of antibiotics, the number of bacteria resistant to antibiotics has increased dramatically and is the main cause of morbidity and mortality. This phenomenon can not only lead to the failure of antimicrobial therapy, but also raise concerns about the safety of fish products.

This review examines the current data on fish diseases caused by bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus, dominant virulence factors, problems of identification and antibiotic resistance.

**Key words:** aquaculture, bacterial diseases, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., resistance.

С.С. Бакиев\*, А.К. Бисенбаев

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

\*e-mail: [serik\\_2595@mail.ru](mailto:serik_2595@mail.ru)

### Реттелетін жүйелер жағдайында балық өсіру кезінде *Aeromonas* және *Pseudomonas* тұқымдарының бактериялары тудыратын аурулары

Әлемдік балық өндірісіндегі аквакультураның үлесі өте жоғары және осы экономика секторындағы (өндіріс және сауда саласында) өнімнің жалпы құнының қалыптасуына әсері де жеткілікті дәрежеде. 2016 жылы балық аулау және аквакультура өнімдерін сатудың жалпы құны 362 млрд АҚШ долларын құраса, оның 232 млрд АҚШ доллары аквакультура өнімінен түскені анықталды. 1961-2016 жылдар аралығында азық-түлік балықтарын әлемдік тұтынудың орташа жылдық өсуі (3,2 пайыз) популяцияның өсуінен 1,6 пайызға асып, барлық құрлықтағы жануарлардың етін тұтынудан 2,8 пайызға асып түсті. Температура, оттегі және гидрохимиялық режимдер сияқты оңтайлы өсіру жағдайларын жасау арқылы балықтардың өсуі мен жыныстық жетілу уақыты едәуір қысқарады, бұл өндірістік аквакультура саласының дамуына ықпал етеді. Алайда, аквакультураның қарқынды дамуы бактериялық инфекциядан туындаған аурулардың өршуімен үйлесіп отырды, бұл балықтардың жоғары деңгейде өлуіне, ал ол өз кезегінде шектен тыс экономикалық шығындарға әкелді. Инфекциялық аурулардың өршуі, балықтарды өсіру жағдайларының күрт өзгеруіне, сондай-ақ балықтардың белгілі бір көлемге қатысты тығыздығының артуына байланысты туындайтын стресстік факторлардың әсерінен тез арада пайда болуы мүмкін. Аквакультурадағы ең ауыр бактериялық аурулар бұл *Aeromonas* және *Pseudomonas* тұқымдасына жататын бактерия түрлері тудыратын инфекциялар. Геморрагиялық септицемия (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*), фурункулоз (*Aeromonas salmonicida*) ауруларын қоздыратын *Aeromonas* және *Pseudomonas* тұқымдасының бактерия түрлері аквакультура өндірісіндегі шектен тыс экономикалық шығындардың себептері болып табылады. Қазіргі уақытта антибиотиктердің еш бақылаусыз кеңінен және жиі қолданылуына байланысты,



антибиотиктерге төзімді бактериялардың саны күрт өсті және осы бактериялар аквакультура өндірісіндегі балық өлімінің негізгі себебі болып табылады. Бұл құбылыс микробқа қарсы терапияның сәтсіздігіне ғана емес, сонымен қатар балық өнімдерінің адамға қатысты қауіпсіздігі алаңдатушылық тудырып отыр.

Бұл шолуда *Aeromonas* және *Pseudomonas* тұқымдасының бактерия түрлері тудыратын аурулар, вируленттіліктің доминантты факторлары, бактерияларды идентификациялау және антибиотиктерге төзімділіктің қалыптасуы туралы проблемаларға қатысты қазіргі заманғы мәліметтер қарастырылады.

**Түйін сөздер:** аквакультура, бактериялық аурулар, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., төзімділік.

С.С. Бакиев\*, А.К. Бисенбаев

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

\*e-mail: serik\_2595@mail.ru

### **Заболевания, вызываемые бактериями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* при выращивании рыб в условиях регулируемых систем**

Аквакультура представляет более высокую долю мирового производства рыбы и оказывает сильное влияние на ценообразование в секторе в целом (как производстве, так и торговле). Установлено, что общая стоимость продажи продукции рыболовства и аквакультуры в 2016 году оценивалась в 362 млрд долларов США, из которых 232 млрд долларов США приходилось на продукцию аквакультуры. В период с 1961 по 2016 год среднегодовое увеличение мирового потребления пищевой рыбы (3,2 процента) опережало рост популяции (на 1,6 процента) и превышало потребление мяса всех наземных животных, вместе взятых (на 2,8 процента). За счет создания оптимальных условий выращивания таких как температурный, кислородный и гидрохимический режимы, значительно сокращаются сроки роста и полового созревания рыб, что способствует развитию индустриальной аквакультуры. Однако быстрое развитие аквакультуры сопровождается вспышками заболеваний, вызванных бактериальной инфекцией, которые приводят к высокой смертности и катастрофическим экономическим потерям. Массовые вспышки могут происходить внезапно под действием стрессовых факторов, возникающих в связи с резким изменением условий содержания, а также увеличением плотностей посадок объектов выращивания. Наиболее тяжелыми бактериальными заболеваниями в аквакультуре являются инфекции, вызываемые представителями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Бактерии родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* являются возбудителями геморрагической септицемии (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*), фурункулеза (*Aeromonas salmonicida*), ежегодно являющиеся причинами экономических потерь в аквакультуре. В настоящее время из-за широкого и часто неконтролируемого использования антибиотиков количество бактерий, устойчивых к антибиотикам, резко возросло и является основной причиной заболеваемости и смертности. Это явление может не только привести к неудаче антимикробной терапии, но и вызвать опасения относительно безопасности рыбных продуктов.

В настоящем обзоре рассматриваются современные данные о заболеваниях рыб, вызываемые бактериями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, доминирующих факторах вирулентности, проблемы идентификации и устойчивости к антибиотикам.

**Ключевые слова:** аквакультура, бактериальные заболевания, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., резистентность.

## **Introduction**

Growing fish in aquaculture contributes to the conservation of biological diversity, and is also aimed at providing the world's population with additional protein as a necessary daily nutritional component of the human diet.

It should be noted that aquaculture represents a higher share of world fish production and has a strong influence on pricing in the sector as a whole (both production and trade). Thus, the total sales value of fishery and aquaculture products in 2016

was estimated at US \$ 362 billion, of which US \$ 232 billion accounted for aquaculture products. Between 1961 and 2016, the average annual increase in global food fish consumption (3.2 percent) outpaced population growth (1.6 percent) and exceeded the consumption of meat of all land animals combined (by 2.8 percent) [1].

The most severe bacterial diseases in sturgeon aquaculture are infections caused by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Aeromonas*. Today, due to the widespread and often uncontrolled use of antibiotics, the number of antibiotic-resistant bacteria has

increased dramatically and is the leading cause of morbidity and mortality. This phenomenon can not only lead to the failure of antimicrobial therapy, but also raise concerns about the safety of fish products. For this reason, new strategies to combat these drug-resistant pathogens are urgently needed.

In the conditions of industrial aquaculture, where artificial conditions for fish farming are created, there is no dependence on the climatic and geographical characteristics of the area, which allows fish to be raised in fairly optimal conditions [2]. The main fish species that are objects of cultivation in industrial aquaculture are representatives of the families: sturgeon (*Acipenseridae*), salmon (*Salmonidae*), cyprinids (*Cyprinidae*), catfish (*Siluridae*), etc. [3-6]. The objects of cultivation – fish are cold-blooded animals, the body temperature of which depends on the temperature regime of the habitat, thus water as a habitat for fish has a direct effect on their general physiological state. In aquatic conditions, bacteria spread faster than in soil and air [7], in this regard, fish are most vulnerable to bacterial pathogens that cause fish diseases. In the conditions of industrial aquaculture, when fish are constantly in a confined space limited by pools and other containers, the risk of bacterial diseases in fish increases by several orders of magnitude [8]. In this regard, enterprises focused on the artificial reproduction of fish pay special attention to measures for the prevention and treatment of fish. Identifying a pathogenic agent takes a lot of time and money. It is often impossible to clinically identify the pathogen, since bacteria can have an indistinguishable negative effect on the fish organism. Unqualified identification of the pathogen followed by inappropriate treatment can negatively affect the development of the disease and lead to the death of fish.

### Biology of bacteria of the *Aeromonas* genus

*Aeromonas hydrophila* is one of the most widespread representatives of the *Aeromonas* genus, which includes 36 species [9]. Bacteria of the *Aeromonas* genus are characterized as non-spore-forming gram-negative bacilli, the majority (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*) are mobile except for *A. salmonicida*, facultative anaerobes, oxidase-positive, the optimal temperature is in the range from 22 to 28°C, grow at 37°C [10]. In a study by Altwegg M. et al. (1990), it was found that 96% of *A. hydrophila*, 96% of *A. sobria*, 94% of *A. caviae* showed motility. About 80% of *A. hydrophila* and *A. sobria* and only 5% of *A. caviae* are capable of fermenting glucose to form gas [11].

Bacteria of the *Aeromonas* genus are ubiquitous in soil, in water, and are also found in food [12]. The soil serves as a so-called reservoir for cytotoxic and invasive strains of bacteria of the *Aeromonas* genus. Bacterial strains *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria* being in the soil are able to maintain virulence factors for up to 5 months, and therefore there is a risk of human infection, directly related to land work [13]. While the risk of human contamination through soil may be indirect, food has a direct impact on health. Bacteria of the *Aeromonas* genus inhabit foods such as raw meat, raw fish, milk and dairy products. It has been shown that bacteria isolated from 56.8% and 43.1% products are identified as *A. hydrophila* and *A. sobria*, respectively [14].

In the studies of Burke V. et al. (1984), bacteria of the genus *Aeromonas* were identified in the samples both from open water bodies and from drinking water, and it was also shown that chlorination under drinking water standards reduces the number of bacteria, but does not completely exclude them [15].

The bacteria are well adapted to aquatic life, making them dangerous to most aquatic animals. Fish species exposed to diseases caused by aeromonads are presented in Table 1.

**Table 1** – Fish species exposed to diseases caused by bacteria of the *Aeromonas* genus in aquaculture

| Causative agent of the disease | Object of study  | References |
|--------------------------------|--|------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>    | <i>Acipenser baerii</i>                                  | [16]       |
|                                | <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>                         | [17]       |
|                                | <i>Acipenser schrenckii</i>                              | [18]       |
|                                | <i>Acipenser sinensis</i>                                | [19]       |
|                                | <i>Oncorhynchus mykiss</i>                               | [20]       |
|                                | <i>Cyprinus carpio L.</i>                                | [21]       |
|                                | <i>Clarias gariepinus</i>                                | [22]       |
| <i>Aeromonas caviae</i>        | <i>Clarias gariepinus</i>                                | [23]       |
|                                | <i>Oreochromis niloticus</i>                             | [24]       |
| <i>Aeromonas sobria</i>        | <i>Acipenser baerii</i>                                  | [17]       |
|                                | <i>Clarias betrachus</i>                                 | [25]       |
| <i>Aeromonas veronii</i>       | <i>Acipenser stellatus</i> ,                             | [26]       |
|                                | <i>Huso huso</i>   | [27]       |
|                                | <i>Oreochromis niloticus</i><br><i>Carassius gibelio</i> | [28, 29]   |
| <i>Aeromonas salmonicida</i>   | <i>Oncorhynchus masou</i>                                | [30]       |
|                                | <i>Oncorhynchus kisutch</i>                              | [31]       |
|                                | <i>Carassius auratus</i>                                 | [32]       |

### Virulence factors of bacteria of the *Aeromonas* genus

The pathogenicity of bacteria of the *Aeromonas* genus is due to the presence of virulence genes encoding a large number of extracellular proteins, such as aerolysin (AerA), hemolysin (HlyA), cytotoxic heat-labile enterotoxin (Alt), cytotoxic heat-resistant toxin (Ast), cytotoxic heat-labile enterotoxin (Act), lipase (Lip), elastase (Ela), serine protease (Ser), DNase (Exu), polar flagellum (fla), and lateral flagella (laf) [33]. The pathogenic mechanism of their action is based on the use of a special protein secretion system (T2SS and T3SS), which exports virulence factors directly into the host cells. The widely conserved T2SS secretion system is present in all known representatives of *A. hydrophila* and is an integral part of the extracellular secretion of a wide range of virulence factors, including aerolysin, amylases, DNases and proteases [34, 35].

Type III Secretion Systems T3SS, or injectosome, one of several types of bacterial secretion systems, is a protein complex found in several gram-negative bacteria, including members of the *Aeromonas* genus. Through the needle-like structure, the secreted effector proteins toxins are transported directly from the bacterial cell to the eukaryotic host cell, where they have a number of effects that help the pathogen to survive and avoid an immune response. The T3SS secretion system is more common in clinical *Aeromonas* isolates than in aqueous isolates [36, 37].

Isolates of *A. hydrophila* isolated from fish are characterized by the presence of the following virulence genes: Lip (100%), Ela (100%), Exu (30%), Ast (30%), Act (95%), Hly (76), Aer, Ser (100%) [34]. Six virulence genes (aer, alt, ahyB (Ela), gcaT (gene encoding cholesterol acyltransferase), lip and ser) were found in the isolated *A. veronii* strain (CFJY-623) from infected with *Carassius auratus gibelio* [29]. It is noted that the most common virulence factors among bacteria of the *Aeromonas* genus are pore-forming toxin – aerolysin and exotoxin – hemolysin [36, 38].

### Fish diseases caused by bacteria of the *Aeromonas* genus

Aeromonosis (bacterial hemorrhagic septicemia, motile *Aeromonas* septicemia (MAS)) and furunculosis are among the most common diseases of fish, both in the natural environment and in artificial conditions. The causative agents of aeromonosis (also hemorrhagic septicemia, rubella of the fins

and tail) are the following types of bacteria of the *Aeromonas* genus: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, etc., *Aeromonas salmonicida* (furunculosis). Bacteria can enter the fish organism through open damage to the skin and gills, as well as during food consumption [39, 40].

When sturgeons are infected with the *A. hydrophila* bacterium, mortality can reach 100%, which represents large economic losses in the fishing industry [41]. For example, for the Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) the lethal dose of *Aeromonas hydrophila* was  $1.17 \times 10^7$  CFU/ml<sup>-1</sup> [18], the mean lethal dose of the *Aeromonas veronii* isolate (CFJY-623) for the silver Prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) was  $1.31 \times 10^7$  CFU/ml [29].

Aeromonosis or bacterial hemorrhagic septicemia (motile *Aeromonas* septicemia, MAS) in fish can manifest itself clinically as bleeding, abscesses in different parts of the body, mainly in the fins and tail, accumulation of ascitic fluid in internal organs, anemia, and also in more severe cases of infection, the formation of numerous ulcers on the fish body is noted [39]. The formation of ulcers on the body is a consequence of muscle necrosis, which occurs due to the presence of the virulence factor exotoxin A in representatives of bacteria of the *Aeromonas* genus, which promotes tissue decomposition [42]. It is noted that in the USA from motile *Aeromonas* septicemia (MAS), which is characterized by a massive outbreak in catfish raised in aquaculture, the losses amounted to \$ 12 million [43]. Among the bacterial isolates isolated from sturgeon fish, the largest percentage 38.71 falls on *Aeromonas hydrophila*, 13.98% *Aeromonas sobria*, 13.98% were representatives of the *Pseudomonas* genus [44]. In sturgeon fish infected with *Aeromonas hydrophila*, the following clinical signs are noted: darkening of the skin, numerous hemorrhages in the head and abdomen, as well as on the fins [45]. When *Ictalurus punctatus* is infected with the bacterium *Aeromonas hydrophila*, 50% of the mortality is achieved within 12 hours after infection, and by 72 hours the mortality rate increases to 95% [46].

Furunculosis is a disease of mainly salmonids (*Salmonidae*) caused by the bacteria *Aeromonas salmonicida*, a member of the *Aeromonas* genus. As well as *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* causes economic losses in fish farming, especially in the cultivation of Atlantic salmon (*Salmon salar*) in offshore farms, as well as in open water [47]. Furunculosis is characterized by a high proportion of morbidity and mortality rates in fish. During the period of infection with *Aeromonas salmonicida*, so-called boils are formed in fish, which

are necrotic formations with a purulent exudate inside. In sick fish, there is a darkening of the skin, hemorrhages in the internal organs and on the fins, as well as a noticeable decrease in activity, a drop in the consumption of compound feed [40].

The serine protease encoded by the AspA gene in *Aeromonas salmonicida* liquefies the muscle tissue of diseased fish, thereby facilitating the formation of boils [48].

Thus, in the studies of Lin Q. et al. (2019), the death of the Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) occurred within 2 weeks, with infection at a dose of  $1.2 \times 10^6$  CFU/fish, the mortality rate was about 70%, 90% of the mortality rate occurred at a dose of  $1.2 \times 10^7$  CFU/fish [49].

The risk of fish contamination with *Aeromonas spp.* increases when the objects of cultivation are in a state of stress, which can arise in connection with the occurrence of many factors, including abrupt changes in temperature, hydrochemical composition, high planting densities, etc. Wedemeyer G. (1970), Mateus A.P. et al. (2017) state that during the period when the fish is under stress the risk of infection with bacterial pathogens increases several times, so-called outbreaks of mass infections occur [50, 51]. Therefore, in the studies conducted by Gao J. (2019) it was shown that the stress hormone norepinephrine affects the virulence of the bacteria *Aeromonas hydrophila*. It was also determined that norepinephrine has a positive effect on the expression of the following virulence genes (ompW, ahp, aha, ele, ahyR, ompA, fur) *Aeromonas hydrophila*, which increases the level of bacterial pathogenicity [52].

### Biology of bacteria of the *Pseudomonas* genus

Bacteria of the *Pseudomonas* genus represent a large group of 144 species. *Pseudomonas* are characterized as gram-negative movable rods, the mobility of which is carried out due to the presence of a single or several polar flagella. Representatives of the *Pseudomonas* genus are able to survive in a fairly wide temperature range from 4 (*P. fluorescens*) to 41°C (*P. aeruginosa*). *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* are united in the group of bacteria with fluorescent diffusing pigments [10, 53]. Thus, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, and others are capable of producing a yellow-green fluorescent pigment known as pyoverdine, this feature is often used to differentiate bacteria of the *Pseudomonas* genus [54]. Bacteria of the *Pseudomonas* genus are ubiquitous in soil and water. And also bacteria are causative agents of various diseases in plants, animals and humans [55].

*P. aeruginosa* is one of the most widespread species of bacteria of the *Pseudomonas* genus in the soil. Therefore, in the studies of Green S. et al. (1974), 58 soil samples were taken in various agricultural areas of California, of which 24% of the sample contained the *P. aeruginosa* bacterium. Thus, the soil is a reservoir for bacteria of the *Pseudomonas* genus [56]. The authors note that the widespread prevalence of bacteria of the *Pseudomonas* genus in soil represents a large community of bacteria, which is an important factor in stimulating plant growth and biological control of pathogenicity [57, 58].

Bacteria of the *Pseudomonas* genus are also common in water, for example, *P. aeruginosa* isolates were isolated from rivers, lakes, and open ocean waters [59]. Besides natural bodies of water, *Pseudomonas spp.* quite often found in drinking water and water supply systems, and therefore there is a risk of human infection with a bacterial pathogen. In addition, isolates isolated from drinking water samples often exhibit a high level of antibiotic resistance, which is the cause of many clinical diseases [60, 61]. For example, bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas maltophilia*, represent about 80% of all clinical human diseases caused by representatives of the *Pseudomonas* genus [53].

Bacteria of the *Pseudomonas* genus, being widespread inhabitants of water, pose a great danger to most aquatic organisms, for example, such fish species (Table 2) and marine mammals (*Zalophus californianus*, *Phoca vitulina*) [62]. In fish, the most common pathogens from the *Pseudomonas* genus are the following species: *P. fluorescens*, *P. putida* and *P. aeruginosa*.

**Table 2** – Major pathogens causing pseudomonosis disease in aquaculture

| Causative agent of the disease | Object of study  | References           |
|--------------------------------|--|----------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | <i>Cyprinus carpio</i> ,<br><i>Oreochromis niloticus</i> ,<br><i>Clarias gariepinus</i>                        | [63]                 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>Acipenser baerii</i><br><i>Clarias gariepinus</i> ,<br><i>Oreochromis niloticus</i> ,<br><i>Liza ramada</i> | [64, 17]<br>[65]     |
| <i>Pseudomonas putida</i>      | <i>Acipenser baerii</i><br><i>Oncorhynchus mykiss</i><br><i>Liza ramada</i>                                    | [17]<br>[66]<br>[65] |

### Virulence factors of bacteria of the *Pseudomonas* genus

As pathogenic microorganisms of many animals and humans, bacteria of the *Pseudomonas* genus are characterized by the presence of the following virulence factors: endotoxin, thermostable hemolysin, proteases (elastase, alkaline), exoenzyme S, toxin A, etc. About 90% of all species of bacteria of the *Pseudomonas* genus are capable of producing toxin A, the most dangerous from virulence factors [53]. In the studies of Haghfi F. et al. (2018), the isolated *P.aeruginosa* isolates contained 14 virulent genes. For example, 97.8% of the strains contained toxA (encoding toxin A), 96.7% plcH (hemolytic phospholipase C), 96.7% phzI (phenazine operons), 93.1% exoY (adenylate cyclase), 20.4% exoT (exotoxin T) [67]. Studies of *P.aeruginosa* isolates from food are also pathogenic. So isolates isolated from meat contained the following virulence genes 96.7% of the strains studied contained the lasB (LasB elastase) and exoS (exozyme S) gene, 74.5% algD (alginate), 72.1% plcH (phospholipase C). Strains isolated from fresh fish contained 71.4% lasB, 77.5% algD, 75.5% plcH and 67.3% exoS [68].

### Fish diseases caused by bacteria of the *Pseudomonas* genus

Pseudomonosis (also fin rot, hemorrhagic septicemia) is characterized as an infectious disease of fish that live in natural reservoirs, as well as those grown in regulated systems. The main causative agents of pseudomonosis are bacteria: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas anguilliseptica* [69, 70]. Bacteria of the *Pseudomonas* genus are representatives of the intestinal microflora of many fish. Sivakami R. revealed that in the studied species of cyprinids (*Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Cyprinus carpio*), more than 50% of intestinal bacteria are bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [71]. Under these conditions, there is a risk of mass fish diseases caused by stress in connection with changes in the environment, which include changes in temperature, oxygen, and hydrochemical regimes [72].

Hemorrhagic septicemia is the cause of high fish mortality in aquaculture. The pathogenicity of most bacteria of the *Pseudomonas* genus is characterized by the presence of virulence factors (protease, elastase, phospholipase C, and exotoxin A), which, in turn, are the main agents in the destruction of

muscle tissue and the occurrence of bleeding in fish [73]. When rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is infected with the bacterium *Pseudomonas putida*, darkening of the skin, exophthalmia, and deep penetrating ulcers in the back are noted in fish, while no changes from the norm in the internal organs were noted. The mortality rate of rainbow trout in water contaminated with a bacterium (*Pseudomonas putida*,  $5 \times 10^6$  CFU/ml<sup>-1</sup>) was 35% [66].

Pseudomonosis and aeromonosis caused by bacteria of the *Pseudomonas* and *Aeromonas* genus are one of the most common diseases in sturgeon rearing in recirculating aquaculture systems (RAS). Thus, in the studies of Sergaliyev N. et al. (2017), of all the studied species of sturgeon fish (*Acipenser gueldenstaedtii*, *Huso huso*, *Acipenser ruthenus*, *Acipenser baerii*, *Acipenser nudiiventris* and their hybrids), about 43.7% of diseases account for aeromonosis and pseudomonosis. In the studied sturgeon fish with pseudomonosis, the following clinical signs are noted: blood clots on the body, pupillary constriction, and in severe forms of the disease, necrosis of muscle tissue and deep penetrating tongues are found in fish [74]. In addition, it is noted that the mortality of the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) from the disease caused by the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in 2005 was 40% in one of the fish farms in Italy. At the same time, the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) shows changes in internal organs, namely, swelling of the swim bladder and hemorrhages in the intestine [64].

### Identification of bacterial pathogens of fish

In microbiology, one of the main research tasks is to determine the belonging of microorganisms and their systematization [75]. Identification is complicated primarily by the size of the microorganisms. In aquaculture, microorganisms are widespread, some of them are used purposefully to solve the problems of purification, mineralization, and disinfection of water, others are less useful or have a completely negative effect on fish, which often include bacteria [76, 77]. The main methods for identifying bacterial pathogens are the determination of morphobiological (staining followed by microscopy), biochemical characteristics (response chemical reactions of bacteria), as well as the use of molecular genetic analysis (PCR, sequencing) [78].

For example, identification of bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus at the level of morphology is quite difficult, the difficulty lies in the fact that bacteria of these genera have almost identical morphology, since bacteria of the *Aeromonas*

and *Pseudomonas* genus are characterized as gram-negative rods, stained pink and red (staining by the method Gram), bacteria are also characterized by the presence of flagella [79]. Therefore, for a more detailed study of pathogenic bacteria in aquaculture with pseudomonosis and aeromonosis of fish, along with morphobiological signs, biochemical characteristics are determined. For example, standard tests and responses are used to identify gram-negative bacteria, which include: oxidase and indole tests, determination of carbohydrate fermentation, ONPG test, amino acid decarboxylation and hydrolysis tests, gelatin dilution test, Voges-Proskauer test, oxidative-fermentative (OF) test, etc. [10]. In addition, to determine the taxonomy, bacteria use differential (selective) nutrient media, with which you can separate bacteria by genus. For example, *Aeromonas* agar is used to identify aeromonads (proteose peptone, yeast extract, lactose, inositol, sorbitol, xylose, lysine monohydrochloride, arginine monohydrochloride, sodium chloride, bile salts no. 3, sodium thio-sulfate, ammonium iron citrate, bromolthymol blue, thymol blue, ampicillin and agar). When *Aeromonas hydrophila* grows, colonies are presented as green with a dark center; fermentation of trehalose is also noted [80, 81]. *Pseudomonas* agar (gelatin peptone, casein hydrolyzate, potassium sulfate, anhydrous, magnesium chloride, anhydrous, agar, cetrinide, fusidic acid and cephaloridin), King's A medium (gelatin peptone (pancreatic), magnesium chloride and agar) the principle of media is based on the production of blue-green pigment by bacteria (fluorescent pyoverdin) [82-85]. Biochemical characteristics of bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus isolated from diseased fish are presented in Table 3.

**Table 3** – Biochemical characteristics of isolates of bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus from sick fish [65]

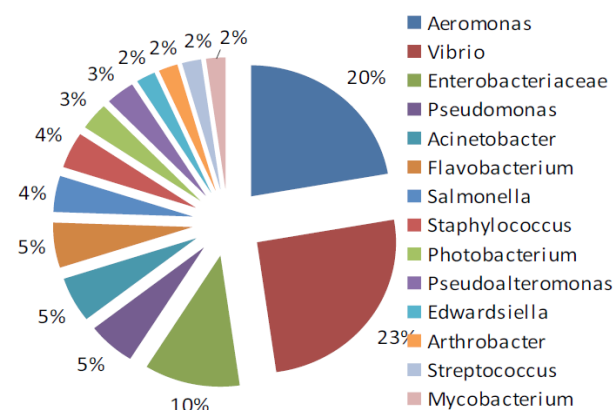
| Characteristics (tests) | <i>Aeromonas</i> | <i>Pseudomonas</i> |
|-------------------------|------------------|--------------------|
| Gram stain              | -                | -                  |
| Cell shape              | rod              | Rod                |
| Motility                | +                | +                  |
| Colony color            | dark green       | yellow-green       |
| Oxidase test            | +                | +                  |
| Indole production       | +                | -                  |
| Methyl red              | -                | +                  |
| Voges-Proskauer         | +                | -                  |
| Hydrolysis of gelatin   | +                | +/-                |
| Utilization of glucose  | +                | -                  |
| Mannitol                | +                | +                  |
| Maltose                 | +                | +                  |
| Catalase                | +                | +                  |

The most effective method for differentiating bacterial pathogens is molecular genetic, as it is characterized by high identification accuracy at the genus and even species level. Since today there are many databases with the nucleotide sequences of most microorganisms, the use of the polymerase chain reaction (PCR) method is one of the most common, time-consuming method for determining the genus and species of microorganisms. The use of universal bacterial primers helps differentiate bacteria from other microorganisms. The principle of PCR identification is based on the use of specially synthesized primers (for example, genus- or species-specific), which, by means of complementarity between the studied template and primers, amplify the studied gene region for further research. For PCR identification, the most commonly used primers of the 16S rRNA gene, virulent genes, etc. For example, to identify such bacterial pathogens of fish as *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*, specific primers are used to amplify 16S rRNA and 16S rDNA genes [20, 29, 86]. In addition, to build a phylogenetic tree of the studied bacterial strains, a specific gene (16S rRNA, gyrB, etc.) or a complete genome is sequenced. It is noted that the sequence of the gyrB gene encoding the B protein of DNA gyrase, like the 16S rRNA gene, can be used to construct a phylogenetic tree and species identification of bacteria [87]. It was also determined that the rate of molecular evolution of the gyrB gene is higher than that of 16S rRNA; in turn, the gyrB gene is ubiquitous among bacterial species [88]. So in the studies of Di J. et al. (2018), Chen F. et al. (2019) to determine the relationship and origin of isolated strains of bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, they sequenced certain regions of the 16S rRNA, gyrB, and rpoD genes [19, 29].

### Antibiotic resistance of bacteria

The acquisition of genetic resistance by bacteria to antibiotics used against them and therapeutic agents based on them is today one of the leading problems not only in aquaculture, but also in medicine, as well as in the food industry. In this regard, the increasing level of bacterial resistance poses a serious danger to humans, animals, and plants [89]. The high resistance of bacteria to antibiotics is due to the presence of antibiotic resistance genes (ARG) in the genome of microorganisms, which are responsible for resistance to a specific antibacterial agent. It is noted that one of the main genetic mechanisms for the propagation of ARG is mobile genetic elements,

the so-called integrons, which are capable of propagating antibiotic resistance genes through transmissible plasmids and transposons [90]. Thus, bacterial resistance to antibiotics is increasingly observed in bacterial pathogens of fish reared in recirculating aquaculture systems, the main reason being the excessive unregulated use of antibiotics in the prevention and treatment of fish. The authors of Lulijwa R. et al. (2019) note that in the period from 2008 to 2018, from 15 countries with developed fisheries in 11 countries (China, Indonesia, India, Vietnam, the Philippines, Bangladesh, South Korea, Egypt, Norway, Japan, Chile, etc.) 67 antibiotics were used, of which 73% were oxytetracycline, sulfadiazine and florfenicol [91]. Bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus are representatives of multiresistant organisms that exhibit resistance to several antibiotics [73, 92]. Thus, in studies conducted by Matyar F. et al. (2010) it was determined that 66.6% of isolates of the *Aeromonas* genus showed resistance to cefazolin, 66.6% to trimethoprim-sulfamethoxazole, at the same time, isolates of the genus *Pseudomonas* showed a high level of resistance to nitrofurantoin (86, 2%), cefazolin (84.8%) and cefuroxime (71.7%) [93]. According to the latest results of the analysis carried out by Preena P. et al. (2020), it is noted that among bacterial pathogens in aquaculture that exhibit antibacterial resistance are bacteria of the *Vibrio* (23%), *Aeromonas* (20%), *Enterobacteriaceae* (10%), *Pseudomonas* (5%) genus and others (Figure 1) [94].



**Figure 1** – Percentage of antimicrobial resistance exhibited by various fish pathogens [94]

Thus, the presented review characterizes bacteria of the *Aeromonas* and *Pseudomonas* genus as one of the most common causative agents of bacterial diseases of fish grown in industrial aquaculture, possessing a wide arsenal of virulence factors and high resistance to antibiotics, as well as increasingly showing multiresistance.

### Funding

This work was funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, grants No. AP09259735.

### References

- 1 FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture (2018) Meeting the sustainable development goals. Rome, Italy. 210 p.
- 2 Badiola M., Mendiola D., Bostock J. (2012) Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*, vol. 51, pp. 26–35. doi:10.1016/j.aquaeng.2012.07.004.
- 3 Bronzi P., Rosenthal H., Gessner J. (2011) Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 27, no. 2, pp. 169–175. doi:10.1111/j.1439-0426.2011.01757.x.
- 4 Frank Asche, Kristin H. Roll, Hilde N. Sandvold, Arne Sørvig, Dengjun Zhang (2013) Salmon aquaculture: larger companies and increased production. *Aquaculture Economics & Management*, vol. 17, no. 3, pp. 322-339. DOI: 10.1080/13657305.2013.812156.
- 5 Mohammad Mustafizur Rahman (2015) Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science*, vol. 8, no. 4, pp. 399-410, DOI: 10.1080/21553769.2015.1045629.
- 6 Dauda A.B., Natrah I., Karim M., Kamarudin M.S., Bichi, A.H. (2018) African Catfish Aquaculture in Malaysia and Nigeria: Status, Trends and Prospects. *Fisheries and Aquaculture Journal*, vol. 9, pp. 1-5.
- 7 Roszak D., Colwell, R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment // *Microbiological reviews*, vol. 51, no. 3, pp. 365-79.
- 8 Aruety T., Brunner T., Ronen Z., Gross A., Sowers K., Zilberg D. (2016) Decreasing levels of the fish pathogen *Streptococcus iniae* following inoculation into the sludge digester of a zero-discharge recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture*, vol. 450, pp. 335–341. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.002.
- 9 Fernández-Bravo A, Figueras M.J. (2020) An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*, vol. 8, no. 1, pp. 129. doi: 10.3390/microorganisms8010129. PMID: 31963469; PMCID: PMC7022790.
- 10 Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Stanley J.T., William S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, 787 p.



- 11 Altwegg M., Steigerwalt A.G., Altwegg-Bissig R., Lüthy-Hottenstein J., Brenner D.J. (1990) Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *J Clin Microbiol*, vol. 28, no. 2, pp. 258-64. doi: 10.1128/JCM.28.2.258-264.1990. PMID: 2312673; PMCID: PMC269587.
- 12 Batra P., Mathur P., Misra M. C. (2016) *Aeromonas* spp.: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Journal of laboratory physicians*. vol. 8, no. 1, pp. 1–4. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.176234>.
- 13 Brandi G., Sisti M., Schiavano G. F., Salvaggio L., Albano, A. (1996) Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 81, no. 4, pp. 439–444. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb03531.x.
- 14 Alhazmi M.I. (2015) Isolation of *Aeromonas* spp. from Food Products: Emerging *Aeromonas* Infections and Their Significance in Public Health. *J AOAC Int.*, vol. 98. no. 4, pp. 927-9. doi: 10.5740/jaoacint.14-257. PMID: 26268974.
- 15 Burke V., Robinson J., Gracey M., Peterson D., Partridge K. (1984) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Applied and environmental microbiology*, vol. 48. no. 2, pp. 361–366. <https://doi.org/10.1128/AEM.48.2.361-366.1984>.
- 16 Cao H., He S., Lu L., Hou L. (2010) Characterization and Phylogenetic Analysis of the Bitrichous Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Isolated from Diseased Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, vol. 62, no. 3, pp. 181-188. [http://cmsadmin.atp.co.il/Content\\_siamb/editor/62\\_3\\_7\\_Cao.pdf](http://cmsadmin.atp.co.il/Content_siamb/editor/62_3_7_Cao.pdf).
- 17 Kayis S., Er A., Kangel P., Kurtoğlu I.Z. (2017) Bacterial pathogens and health problems of *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii* sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey. *Iran J Vet Res.*, vol. 18. no. 1, pp. 18-24.
- 18 Meng Y., Xiao H.B., Zeng, L.B. (2011) Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen from Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 27, pp. 799-803. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01717.x>.
- 19 Di J., Zhang S., Huang J., Du H., Zhou Y., Zhou Q., Wei Q. (2018) Isolation and identification of pathogens causing haemorrhagic septicemia in cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Aquac Res.*, vol. 49, pp. 3624– 3633. <https://doi.org/10.1111/are.13830>.
- 20 Yazdanpanah Laleh, Zorriehzahra Jalil, Rokhbakhsh Zamin Farokh, Kazemi-Pour Nadia (2020) Isolation, biochemical and molecular detection of *Aeromonas hydrophila* from cultured *Oncorhynchus mykiss*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, pp. 1-15. DOI: 10.22092/ijfs.2020.122060.
- 21 Guz L., Kozińska A. (2004) Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull Vet Inst Pulawy.*, vol. 48, pp. 391-395. <http://www.piwet.pulawy.pl/bulletin/images/stories/pdf/20044/20044391396.pdf>.
- 22 Laith A. R., Najiah M. (2014) *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*, vol. 5, no. 2, pp. 215 ref.44. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143259523>.
- 23 Anyanwu Madubuike, Chah Kennedy, Shoyinka Shodeinde (2014) Antibigram of aerobic bacteria isolated from skin lesions of African catfish cultured in Southeast, Nigeria. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, vol. 2, pp. 134-141.
- 24 Roy A., Singha J., Abraham T.J. (2018) Histopathology of *Aeromonas caviae* infection in challenged Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *International Journal of Aquaculture*, vol. 8, no. 20, pp. 151-155. doi: 10.5376/ija.2018.08.0020.
- 25 Ashiru A., Uaboi-Egbeni P.O., Oguntowo J.E., Idika C.N. (2011) Isolation and Antibiotic Profile of *Aeromonas* Species from Tilapia Fish (*Tilapia nilotica*) and Catfish (*Clarias bethracus*). *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 10, pp. 982-986.
- 26 Gholamhosseini A, Taghadosi V, Shiry N, Akhlaghi M, Sharifiyazdi H, Soltanian S, Ahmadi N. (2018) First isolation and identification of *Aeromonas veronii* and *Chryseobacterium joostei* from reared sturgeons in Fars province. *Iran. Vet Res Forum. Spring.*, vol. 9, no. 2, pp. 113-119. doi: 10.30466/VRF.2018.30826. PMID: 30065799; PMCID: PMC6047580.
- 27 Mohamed A Hassan, E.A. Noureldin, Mahmoud A. Mahmoud, Nabil A. Fita, (2017) Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, vol. 43, pp. 161-167, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.06.001>.
- 28 Sun J., Zhang X., Gao X., Jiang Q., Wen Y., Lin L. (2016) Characterization of Virulence Properties of *Aeromonas veronii* Isolated from Diseased Gibel Carp (*Carassius gibelio*). *Int J Mol Sci. Apr.*, vol. 17, no. 4, pp. 496. doi: 10.3390/ijms17040496. PMID: 27043558; PMCID: PMC4848952.
- 29 Chen F., Sun J., Han Z., Yang X., Xian J. A., Lv A., Hu X., Shi H. (2019) Isolation, Identification and Characteristics of *Aeromonas veronii* From Diseased Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*). *Frontiers in microbiology*, vol. 10, pp. 2742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02742>.
- 30 Fryer J.L., Hedrick R.P., Park J.W., Hah Y.C. (1988) Isolation of *Aeromonas salmonicida* from masu salmon in the Republic of Korea. *J Wildl Dis.*, vol. 4, no. 2, pp. 364-5. doi: 10.7589/0090-3558-24.2.364. PMID: 3373645.
- 31 Chapman P.F., Cipriano R.C., Teska J.D. (1991) Isolation and phenotypic characterization of an oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* causing furunculosis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Wildl Dis.*, vol. 27, no. 1, pp. 61-7. doi: 10.7589/0090-3558-27.1.61. PMID: 1850808.
- 32 Nikapitiya C., Dananjaya S.H.S., Chandrarathna H.P.S.U. et al. (2019) Isolation and Characterization of Multidrug Resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and Its Infecting Novel Phage ASP-1 from Goldfish (*Carassius auratus*). *Indian J Microbiol.*, vol. 59, pp. 161–170. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00782-5>.
- 33 Zhou Y., Yu L., Nan Z. et al. (2019) Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC Infect Dis.*, vol. 19, pp. 158. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3766-0>.
- 34 Alsaid Milud (2015) Virulence Genes Detection of *Aeromonas hydrophila* Originated from Diseased Freshwater Fishes. *Advances in Environmental Biology*, vol. 9, pp. 22-26.



- 35 Rasmussen-Ivey C.R., Figueras M.J., McGarey D., Liles M.R. (2016) Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Front. Microbiol.*, vol. 7, pp. 1337. doi: 10.3389/fmicb.2016.01337.
- 36 Pollard D. R., Johnson W. M., Lior H., Tyler S. D., Rozee K. R. (1990) Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, vol. 28, no. 11, pp. 2477–2481. <https://doi.org/10.1128/JCM.28.11.2477-2481.1990>.
- 37 Vilches S., Jimenez N., Tomas J. M., Merino S. (2009) *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, pp. 6382–6392. doi: 10.1128/AEM.00222-09
- 38 Wang G., Clark C. G., Liu C., Pucknell C., Munro C. K., Kruk T. M., Caldeira R., Woodward D. L., Rodgers F. G. (2003) Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, vol. 41, no. 3, pp. 1048–1054. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1048-1054.2003>.
- 39 Dallaire-Dufresne S., Tanaka K. H., Trudel M. V., Lafaille A., Charette S. J. (2014) Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, vol. 169, no. 1-2, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.025.
- 40 Stratev D., Odeyemi O.A. (2017) An overview of motile *Aeromonas septicemia* management. *Aquacult Int.*, vol. 25, pp. 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0100-3>.
- 41 Jiang N. et al. (2016) Overview of sturgeon pathogenic disease research. *Journal of Hydroecology*, vol. 37, pp. 1–9.
- 42 Masuyer G. (2020) Crystal Structure of Exotoxin A from *Aeromonas* Pathogenic Species. *Toxins*, vol. 12, no. (6) 397, pp. 1-14. doi:10.3390/toxins12060397.
- 43 Hossain M. J., Sun D., McGarey D. J., Wrenn S., Alexander L. M., Martino M. E., Xing Y., Terhune J. S., Liles M. R. (2014) An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish. *mBio*, vol. 5, no. 3st, e00848-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00848-14>.
- 44 Santi M., Pastorino P., Fogliani C., Righetti M., Pedron C., Prearo M. (2019) A survey of bacterial infections in sturgeon farming in Italy. *J Appl Ichthyol.*, vol. 35, pp. 275–282. <https://doi.org/10.1111/jai.13802>.
- 45 Timur G., Akaylı T., Korun J., Yardımcı R.E. (2010) A study on bacterial haemorrhagic septicemia in farmed young russian sturgeon in Turkey (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Journal of Aquatic Sciences*, vol. 25, pp. 19-26.
- 46 Zhang D., Xu D.-H., Shoemaker C. (2016) Experimental induction of motile *Aeromonas septicemia* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Reports*, vol. 3, pp. 18–23. doi:10.1016/j.aqrep.2015.11.003.
- 47 O'Brien D., Mooney J., Ryan D., Powell E., Hiney Maura, Smith P., Powell R. (1994) Detection of *Aeromonas salmonicida* causal agent of furunculosis in Salmonid fish from the tank effluent of hatchery-reared Atlantic salmon smolts. *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, pp. 3874-7. 10.1128/AEM.60.10.3874-3877.1994.
- 48 Coleman G., Whitby P. W. (1993) A comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* with those of other subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites. *Journal of General Microbiology*, vol. 139, no. 2, pp. 245–249. doi:10.1099/00221287-139-2-245.
- 49 Lin Qiang, Li Jie, Fu Xiaozhe, Liu Lihui, Liang Hongru, Niu Yinjie, Huang Chuni, Huang Zhibin, Mo Zhaolan, Li Ningqiu (2019) Hemorrhagic gill disease of Chinese perch caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in China. *Aquaculture*, vol. 519, 734775. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734775>.
- 50 Wedemeyer G. (1970) The role of stress in the disease resistance of fishes and shellfishes. *Spec. Publ.*, no. 5, Am. Fish. Soc., Washington, D.C., pp. 30-35.
- 51 Mateus A. P., Power D. M., Canário A. V. M. (2017) Stress and Disease in Fish. *Fish Diseases*, pp. 187–220. doi:10.1016/b978-0-12-804564-0.00008-9.
- 52 Gao J., Xi B., Chen K., Song R., Qin T., Xie J., Pan L. (2019) The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiologyopen*, vol. 8, no. 4, e00664. doi: 10.1002/mbo3.664. Epub Jun 13. PMID: 29897673; PMCID: PMC6460269.
- 53 Baron S, editor. (1996) *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1273 p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>.
- 54 Meyer J.M. (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol.*, vol. 174, no. 3, pp. 135-42. doi: 10.1007/s002030000188. PMID: 11041343.
- 55 Noura, Salih K.M., Jusuf N.H., Hamid A.A., Yusoff W.M. (2009) High prevalence of *Pseudomonas* species in soil samples from Ternate Island-Indonesia. *Pak J Biol Sci.*, vol. 12, no. 14, pp. 1036-40. doi: 10.3923/pjbs.2009.1036.1040. PMID: 19947183.
- 56 Green S. K., Schroth M. N., Cho J. J., Kominos S. K., Vitanza-jack V. B. (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology*, vol. 28, no. 6, pp. 987–991.
- 57 Jaya Tripathi P. T. S. R. E. (2011) In Vitro Study of *Pseudomonas* spp. Isolated from Soil. *Journal of Phytology*, vol. 3, no. 4. <https://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/view/2267>.
- 58 Sah S., Singh R. (2016) Phylogenetical coherence of *Pseudomonas* in unexplored soils of Himalayan region. *3 Biotech.*, vol. 6, no. 2, pp. 170. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0493-8>.
- 59 Khan N. H., Ishii Y., Kimata-Kino N., Esaki H., Nishino T., Nishimura M., Kogure K. (2007) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Open Ocean and Comparison with Freshwater, Clinical, and Animal Isolates. *Microbial Ecology*, vol. 53, no. 2, pp. 173–186. doi:10.1007/s00248-006-9059-3.
- 60 Vaz-Moreira I., Nunes O. C., Manaia C. M. (2012) Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of The Total Environment*, vol. 426, pp. 366–374. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.046.

- 61 Flores Ribeiro A., Bodilis J., Alonso L., Buquet S., Feuilloley M., Dupont J.-P., Pawlak B. (2014) Occurrence of multi-antibiotic resistant *Pseudomonas* spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems. *Science of The Total Environment*, vol. 490, pp. 370–378. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.012.
- 62 Gaffney P., Colegrove K., Gulland F., Byrne B., Jang S., Edgar K., Lowenstine L. J. (2008) Pathologic, microbiologic and epidemiologic characterization of *Pseudomonas* sp. In California sea lions (*Zalophus californianus*) and Pacific harbor seals (*Phoca vitulina*). In Proceedings of the 39th Annual Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine, pp. 10-14. <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3863207&pid=11259>.
- 63 Magdy I.H., El-Hady M., Ahmed H.A., Elmeadawy S.A., Kenwy A.M. (2014) A contribution on *Pseudomonas aeruginosa* infection in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, vol. 5, pp. 575-588.
- 64 Brunetti Rinaldo, Gasparri Filippo, Marturano Stefano, Prearo Marino (2006) *Pseudomonas fluorescens* infection in farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Ittiopatologia*, vol. 3, pp. 221-226.
- 65 El-Barbary Manal, Hal Ahmed (2016) Isolation and molecular characterization of some bacterial pathogens in El-Serw fish farm, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, vol. 20, pp. 115-127. 10.21608/ejabf.2016.11183.
- 66 Altinok Ilhan, Kayis Sevki, Capkin Erol (2006) *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, vol. 261, pp. 850-855. 10.1016/j.aquaculture.2006.09.009.
- 67 Haghi F., Zeighami H., Monazami A., Toutouchi F., Nazarian S., Naderi G. (2018) Diversity of virulence genes in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial Pathogenesis*, vol. 115, pp. 251–256. doi:10.1016/j.micpath.2017.12.052.
- 68 Benie C., Dadie A., Guessennd N., N'gbesso-Kouadio N., Désiré K., Coulibaly N. D., Aka S., Dako E., Djè K., Dosso M. (2017) Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish. *European Journal of Microbiology and Immunology*, vol. 7, no. 1, pp. 55–64. doi:10.1556/1886.2016.00039.
- 69 El-Hady M. A., Samy A. A. (2011) Molecular typing of *Pseudomonas* species isolated from some cultured fishes in Egypt. *Global Veterinaria*, vol. 7, no. 6, pp. 576-580.
- 70 Zhang J. T., Zhou S. M., An S. W., Chen L., Wang G. L. (2014) Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), caused by a bacterial pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*. *Journal of fish diseases*, vol. 37, no. 2, pp. 113-121.
- 71 Sivakami R., Premkishore G., Chandran M. R. (1996) Occurrence and distribution of potentially pathogenic Enterobacteriaceae in carps and pond water in Tamil Nadu, India. *Aquaculture Research*, vol. 27, no. 5, pp. 375–378. doi:10.1111/j.1365-2109.1996.tb01263.x.
- 72 Raman R., Prakash C., Makesh M., Pawar N.A. (2013) Environmental stress mediated diseases of fish: an overview. *Advances in Fish Research*, vol. 5, pp. 141–158.
- 73 Algammal A.M., Mabrok M., Sivaramasamy E. et al. (2020) Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and blaTEM, blaCTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes. *Sci. Rep.*, vol. 10, 15961. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4>.
- 74 Sergaliyev N.H., Absatirov G.G., Tumenov A.N., Sariyev B.T., Ginayatov N.S. (2017) Nosological description of fish pathologies in RAS. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 9, pp. 1637-1641.
- 75 Pitt T. L., Barer M. R. (2012) Classification, identification and typing of micro-organisms. *Medical Microbiology*, pp. 24–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4089-4.00018-4>.
- 76 Sudheesh P. S., Al-Ghabshi A., Al-Mazrooei N., Al-Habshi S. (2012) Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. *International journal of evolutionary biology*, 457264. <https://doi.org/10.1155/2012/457264>.
- 77 Ruiz P., Vidal J.M., Sepúlveda D., Torres C., Villouta G., Carrasco C., Aguilera F., Ruiz-Tagle N., Urrutia, H. (2020) Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems. *Rev Aquacult.*, vol. 12, pp. 1478-1494. <https://doi.org/10.1111/raq.12392>.
- 78 Franco-Duarte R., Černáková L., Kadam S., Kaushik K. S., Salehi B., Bevilacqua A., Corbo M. R., Antolak H., Dybka-Stepień K., Leszczewicz M., Relison Tintino S., Alexandrino de Souza V. C., Sharifi-Rad J., Coutinho H., Martins N., Rodrigues C. F. (2019) Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms-From Past to Present. *Microorganisms*, vol. 7, no. 5, pp. 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>.
- 79 Carter G. R. (1990) *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Vibrio*. *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology*, pp. 77–86. doi:10.1016/b978-0-12-161775-2.50011-6.
- 80 Handfield M., Simard P., Letarte R. (1996) Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol.* vol. 62, no. 9, pp. 3544-7. doi: 10.1128/AEM.62.9.3544-3547.1996. PMID: 8795251; PMCID: PMC168157.
- 81 *Aeromonas* Agar. (2017) Selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila* from environmental samples. Rev.0 / 13.12.2017. [http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/10406\\_IFU.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/10406_IFU.pdf).
- 82 King E.O., Ward M.K., Raney D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med.*, vol. 44, no. 2, pp. 301-7. PMID: 13184240.
- 83 Goto S., Enomoto S. Nalidixic acid cetrimide agar. (1970) A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Microbiol.*, vol. 14, no. 1, pp. 65-72. doi: 10.1111/j.1348-0421.1970.tb00492.x. PMID: 4984597.
- 84 *Pseudomonas* Agar. (2015) Base Selective medium for detection and enumeration of *Pseudomonas* spp., according to ISO 13720, ISO/TS 11059 and ISO 16266. Rev.2 / 02.12.2015. [https://www.humeau.com/media/blfa\\_files/TC\\_Pseudomonas-gelose-base\\_EN\\_020718\\_5137bad7135953d0074481fa4e64a8b4.pdf](https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_Pseudomonas-gelose-base_EN_020718_5137bad7135953d0074481fa4e64a8b4.pdf).

- 85 60788 King Agar A (Pseudomonas Agar for Pyocyanin; Pseudomonas Agar P; Tech Agar) Medium for the confirmation of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin formation. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/60788dat.pdf>.
- 86 Altinok I. (2011) Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease. *Dis Aquat Organ.*, vol. 93, no. 3, pp. 199-206. doi: 10.3354/dao02300. PMID: 21516972.
- 87 Wang L.T., Lee F.L., Tai C.J., Kasai H. (2007) Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol.*, vol. 57, no. Pt 8, pp. 1846-1850. doi: 10.1099/ijs.0.64685-0. PMID: 17684269.
- 88 Kasai H., Watanabe K., Gasteiger E., Bairoch A., Isono K., Yamamoto S., Harayama S. (1998) Construction of the *gyrB* Database for the Identification and Classification of Bacteria. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.*, vol. 9, pp. 13-21. PMID: 11072317.
- 89 World Health Organization (2006) WHO Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 107 p.
- 90 Zhang S., Abbas M., Rehman M.U., Huang Y., Zhou R., Gong S., Yang H., Chen S., Wang M., Cheng A. (2020) Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) via integrons in *Escherichia coli*: A risk to human health. *Environ Pollut.*, vol. 266, no. Pt 2, 115260. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115260. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32717638.
- 91 Lulijwa R., Rupia E. J., Alfaro A. C. (2019) Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, doi:10.1111/raq.12344.
- 92 Hossain S., Dahanayake P., De Silva B., Wickramanayake M., Wimalasena S., Heo G.-J. (2019) Multidrug resistant *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*): antibiogram, antimicrobial resistance genes and class 1 integron gene cassettes. *Lett Appl Microbiol.*, vol. 68, pp. 370-377. <https://doi.org/10.1111/lam.13138>
- 93 Matyar F., Akkan T., Uçak Y., Eraslan B. (2010) *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess.*, vol. 167, no. 1-4, pp. 309-20. doi: 10.1007/s10661-009-1051-1. Epub 2009 Jun 24. PMID: 19551480.
- 94 Preena P. G., Swaminathan T. R., Kumar V. J. R., Singh I. S. B. (2020) Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*, vol. 75, pp. 1497–1517 doi: 10.2478/s11756-020-00456-4.

МРНТИ 34.01.07 – 34.03.17 – 34.03.25

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v87.i2.02>**Э.Э. Ашшурский** Институт научного прогнозирования, Украина, г. Киев  
e-mail: e.ashursky@gmail.com

## **ТРУДНОРАЗРЕШИМЫЕ ПАРАДОКСЫ ЭВОЛЮЦИИ – ВСЕОХВАТЫВАЮЩИМ ВЗОРОМ НАТУРФИЛОСОФА**

Хотя по многим краеугольным для науки вопросам Дарвин действительно опередил свое время, однако если говорить о подлинных механизмах эволюции (как, впрочем, и об отсутствии переходных форм), то они и по сей день остаются объектом острых несомлаемых дискуссий. То же самое касается и такого модного нынче философского понятия, как «вселенская ноосфера»: его ведь многие сейчас трактуют кто во что горазд (в том числе и как вполне реальные вещественные образования, функционирующие, правда, по не совсем пока еще доступным нам закономерностям). Ясно лишь одно: законы эти являются едиными как для живой, так и обычной косной материи. А кроме того, в последние годы большинство современных учёных стали склоняться к выводу, что возникновение и прогрессивное развитие живых существ возможно только лишь при наличии соответствующей программы (плана, проекта).

Статья посвящена стержневым и наиболее дискуссионным проблемам биологии. Главная ее идея состоит в постулировании индивидуального ментала и производной от него коллективной ноосферы в качестве ведущих факторов эволюции. Ведь, так или иначе, именно при их «заинтересованном» участии осуществляются любые наблюдаемые в природе динамические сдвиги. То есть полезные эмоциональные впечатления, накопленные в онтогенезе менталом, служат информационной базой для усовершенствования поведенческих рефлексов у данного конкретного вида. И лишь при каких-то редких скалтациях (наподобие, скажем, преобразования чешуи в перо или передних лап в крылья) можно судить о направляющей деятельности высшего вселенского разума. Хотя речь идёт именно об остаточной («посмертной») уни-сфере, которая терминологически крайне мало связана с общепринятой, да и куда более знакомой философам «шарденовской». Её можно охарактеризовать как гигантский рассеянный в космосе биокомпьютер, действующий хоть и медленней по сравнению с нынешними ЭВМ, но всё же обладающий (через посредство своих послушных вездесущих исполнителей – вирусов) пока что гораздо большей силой и влиянием на судьбы современных мировых цивилизаций.

**Ключевые слова:** видообразование, натурфилософия, системная иерархия, эпигеном, протобионты, энфорсогенез, мультифазная эволюция, глобальный эволюционизм.

E. E. Ashursky

Institute for Scientific Prognosis, Ukraine, Kiev  
e-mail: e.ashursky@gmail.com

### **Intractable paradoxes of evolution – with all-encompassing gaze of a natural philosopher**

Although Darwin was really ahead of his time on many of the most fundamental issues for science, however, if we talk about the true mechanisms of evolution (as, indeed, about the absence of transitional forms), they still remain the object of sharp, incessant discussions. The same applies to such a fashionable philosophical concept as the “universal noosphere”: after all, many people now interpret it in different ways (including as quite real material formations that function, however, according to laws that are not yet completely available to us). Only one thing is clear: these laws are the same for both living and ordinary inert matter. And in addition, in recent years, most modern scientists have begun to tend to the conclusion that the emergence and progressive development of living beings is possible only if there is an appropriate program (plan, project).

The article is devoted to the core and most controversial problems of biology. Its main idea is to postulate the individual mental and the collective noosphere derived from it as the leading factors of evolution. After all, one way or another, it is with their “interested” participation that any dynamic shifts observed in nature are carried out. That is, useful emotional impressions accumulated in ontogenesis by the mental serve as an information base for improving behavioral reflexes in this particular species. And only with some rare saltations (such as, say, the transformation of scales into feathers or forelegs into wings) can we judge the guiding activity of the higher universal mind. Although we are talking about

the residual (“posthumous”) uni-sphere, which is terminologically very little related to the generally accepted, and much more familiar to philosophers, “Chardin’s”. It can be described as a giant biocomputer scattered in space, operating at a slower pace compared to current computers, but still having (through its obedient ubiquitous performers – viruses) so far much more power and influence on the fate of modern world civilizations.

**Key words:** speciation, natural philosophy, system hierarchy, epigenome, protobionts, enforso-genesis, multiphase evolution, global evolutionism.

Э.Э. Ашшурский

Ғылыми болжау институты, Украина, Киев қ.  
e-mail: e.ashursky@gmail.com

### **Эволюцияның шешілмейтін парадокстары – натурфилософтың жан-жақты көзқарасымен**

Дарвиннің ойлары ғылым үшін көптеген өзекті мәселелерден озғанымен, эволюцияның шынайы механизмі туралы талқылаулар (немесе, мысалы, өтпелі формалардың болмауы) әлі де өзекті болып табылады. Қазіргі кезде Әмбебап ғарыштық ноосфераның өзі кең таралған философиялық тұжырымдамаға жатады. Бүгінгі күні көпшілік оны әртүрлі жолдармен түсіндіреді (атап айтқанда, қолданыстағы түзілімдер сияқты, бірақ бізге әлі толық түсініксіз заңдармен). Тек бір нәрсе анық: бұл заңдылықтар тірі және қарапайым инертті заттар үшін бірдей. Сонымен қатар, соңғы жылдары ғалымдардың көпшілігі біртіндеп тірі тіршілік иелерінің пайда болуы мен прогрессивті дамуы тиісті бағдарлама (жоспар, жоба) болған жағдайда ғана мүмкін деген тұжырымға бет бұра бастады.

Мақала биологияның ең даулы мәселелеріне арналады. Оның ең басты идеясы, эволюцияның жетекші факторларына коллективті ноосфераны жатқызу. Табиғаттағы кез келген динамикалық ауысулар дәл осылай немесе басқаша түрде олардың «мүдделі» қатысуымен жүзеге асырылады. Яғни, психикалық дененің онтогенезде жинақталған пайдалы эмоционалдық әсерлері берілген нақты түрлердегі мінез-құлық рефлекстерін жетілдіруге ақпараттық негіз болып табылады. Кейбір сирек кездесетін сальтацияларда ғана (мысалы, қабыршақтың қауырсынға айналуы немесе алдыңғы аяқтардың қанаттарға өзгеруі) жоғары әмбебап ақыл-ойдың жетекші рөліне баға беруге болады. Сөз қалдықтық («өлгеннен кейінгі») уни-сфера туралы, терминологиялық тұрғыдан аз қабылданған, философтар үшін «шарден» атауымен белгілі. Оны космоста алып шашыраған биокомпьютер түрінде, қазіргі ЭВМ-мен салыстырғанда баяу қызмет атқаратын, бірақ (өзінің атқарушы тетіктері – вирустар арқылы) қазіргі дүниежүзілік өркениетке үлкен күшпен әсер етуші деп сипаттауға болады.

**Түйін сөздер:** түртүзілу, натурфилософия, жүйелік иерархия, эпигеном, протобионттар, энфорсогенез, мультифазалық эволюция, жаһандық эволюционизм.

#### **Введение**

Сколько веков существует на Земле наука, столько столетий и идут непрерывные споры между сторонниками креационизма и эволюционизма. Первые в своих доводах [1], упирают обычно на поразительную нерукотворную сложность живых систем, что автоматически как бы увязывается с достаточно призрачной вероятностью их самовозникновения. В то же время другие [2]; [3] козыряют абсолютной естественностью своих аргументов, не требующих введения дополнительных сущностей.

Поскольку на поверку в определённой степени все из них оказываются правы, то, проанализировав имеющиеся у нас факты [4, с. 8 – 37]; [5, с. 198 – 203], мы решили, что правильной всего будет попытаться синтезировать эти полярные, на первый взгляд, концепции в единое целое. Причём приоритет остаётся, конечно

же, за эволюционизмом, поэтому ему мы в дальнейшем как раз и уделим главное наше внимание.

#### **Основная часть**

1. Ну и теперь буквально несколько слов об искусственном воздействии на обыденно-размеренный ход событий в природе. Здесь следует иметь в виду прежде всего таких два варианта: либо этим занимается эволюционная элита [6], опередившая всех на привычном для нас с вами антропогенном пути развития, либо же некие потусторонние /»параллельные»/ сущности, состоящие, например, из иных элементарных частиц, мощных сгустков энергии, лепто-глюоновых конгломератов, квазиэлементов и т.п [7]. Впрочем, оба эти случая характеризуются также и наличием некоторых общих для них «точек пересечения». Прежде всего, сами производители других природных форм, по идее,

должны быть обязаны своим существованием исключительно лишь ее величеству эволюции, так как если мы предположим, что и они в своё время были кем-то созданы, то получается порочный круг, из которого в рамках науки выхода не видно.

Далее, созидательная деятельность всех подобных иерархов наверняка уж должна направляться на удовлетворение каких-то своих сугубо личных запросов и потребностей. Так, «параллельные» цивилизации, вероятно, с немалой охотой воспользовались бы эманационными полями животных и человека для пополнения своего интеллектуального багажа свежими полезными навыками или хотя бы с целью использования дешёвой рабочей силы в лице наших посмертных духов-эманаций. И если исходить из небезызвестного тезиса, будто человек был создан богом по образу своему и подобию, то в переводе на язык науки это скорее всего будет означать, что каждая новая разновидность трансцендентного божества, ангела или даже «беса», появляющаяся на свет в результате развертывания некоего подспудного вектора энергетической эволюции, тотчас же будет производить и наиболее подходящую для своих нужд форму земного организма.

Что же касается родной для нас материальной «сферы влияния», то тут всё в этом плане обстоит и вовсе проще простого. Ибо, как вирусы используют эукариотические геномы для своего беззаботного *modus vivendi*, так же в точности утилитарно и их всеильные грозные преемники по системной иерархии будут обращаться с новосозданными «божьиими тварями». Клетки, как известно, в большинстве случаев не замечают замаскированных в них чужеродных вирусов, а молекулы – многочисленных присосавшихся сбоку протонов водорода. То же самое, судя по всему, происходит и с людьми, когда высшие эволюционные иерархи просто-напросто уже изначально встраиваются в их тела.

Но всё ж таки каким именно образом эти посланцы «ино-элиты» видоизменяют существующие формы живого: с помощью рекомбинации генов или путём целевой перестройки белково-компьютерных программ? А, может, используют для этого коррекцию параметров электромагнитного каркаса? Для получения исчерпывающего ответа на данный вопрос необходимо провести еще множество дополнительных кропотливых исследований, в которых наибольшее внимание должно быть, по-видимому, уделено именно вирусам. Ведь

благодаря своему внутреннему бессмертию, они имели, в общем-то, неограниченную возможность постоянного усовершенствования, т.е. представляют собой (относительно среднегипотетического уровня нуклеиновых кислот) пик развития среди всех живых систем, когда-либо существовавших или будущих существовать.

Кое-кто здесь, правда, может возразить, что молекулы, мол, кремниевой кислоты и натурального каучука также способны к беспредельному росту и размножению посредством регенерации. Но тем не менее они ведут, во-первых, неактивный образ жизни; во-вторых, стареют; ну и наконец, для их размножения требуется что-то вроде метеоритного дождя (а подобные условия у нас на Земле вряд ли когда-либо имели место).

Так что, как видим, кристаллоподобные вирусы даже и тут оказались вне конкуренции. Во всяком случае, человек заведомо никогда не достигнет их великолепно развитых адаптационных возможностей; это под силу разве что роботам, не являющимся, однако, живыми объектами.

В ходе своей доисторической (но зато уж поистине эпохальной!) коэволюции усовершенствовались вирусы вполне обычным и бесхитростным путем – за счет постепенного накопления жизненно необходимых структурных звеньев. Но при этом самые древние их гены (а быть может, и отдельные нуклеотиды) являются в то же время и самыми главными, т.е. регуляторными. Такой ход событий, по крайней мере, представить себе было б, наверное, естественней всего.

2. Все без исключения природные системы способны эволюционировать только в своём свободном саморазвитии – благодаря лучшей приспособляемости к окружающим условиям и за счёт неотъемлемого для систем любого уровня фактора памяти. Так, эволюция гетероциклических оснований закончилась с возникновением мононуклеотидов, совершенствование трёхступенчатых нуклеотидов – с образованием длинных цепочек, названных затем генами; наконец, последние, объединившись в геном, привели к рождению новых и существенно важных кирпичиков одухотворённой материи.

Но, сопоставляя между собой и анализируя различные этапы доклеточной биоэволюции, следует иметь в виду, что структурно-иерархический прогресс отнюдь не стоит на месте. И если на теплой Земле полноправными хозяевами положения были РНК, то сейчас уже таковыми стали чуть-чуть укороченные (по сахару), но зато уж

куда более прочные и разветвленные (по общей массе) их нуклеотидные преемники. Например, для прицельной топической идентификации у человека главной регуляторной хромосомы сегодня необходимо прежде всего досконально разобраться с нашим видоспецифичным эпигеномом и родственным ему кластером белкового гомеоблока. Поскольку же обе эти структуры, по имеющимся данным, полнее всего представлены во 2-й хромосоме, то именно на нее и следует, очевидно, указать как на подлинного командного лидера клетки. Но это еще не всё. Ибо любой без исключения хромосоме присущ феномен одушевленности, реализуемый через обладание собственным «Я». Которое, кстати, по своим структурным параметрам вряд ли может быть объёмистей вышеозначенного кластера, но в то же время заведомо должно содержать в себе (или хотя бы потенциально кодировать) поликомб-белки, микро-РНК и другие важнейшие рычаги прямого управленческого воздействия.

Таким образом, по ходу интерфазы главный геномный локус связывается, рассылая свои целевые директивы, прежде всего с главными генами периферийных хромосом, а те уже переадресовывают его команды дальше – согласно служебному предназначению. При этом единственным более-менее реальным типом связи следует в данном случае признать, судя по всему, звук. А впрочем, какими бы, в конце концов, ни были передаваемые сигналы: виброакустическими, биоимпульсными, электромагнитными или даже экстрасенсорными, – вряд ли это способно играть здесь некую первозначимую роль.

...Но вообще-то становление земной цивилизации начиналось, как известно, с РНК. Причем самосовершенствование их молекул происходило в основном на уровне нуклеопротеидов, так как вряд ли они достаточно длительный исторический отрезок могли просуществовать без столь верных и надежных своих кислотных попутчиков.

Рибонуклеиновые протобионты размножались репликацией с помощью РНК-затравки, после чего вели обычно активный «приусадебный» образ жизни (то есть говоря по-научному, экспрессировались) – используя созданные ими же РсG-белки. Последние причем стали отвечать как за ферментативные реакции, так и пролонгированную дохромосомную память. Кратковременная же память (и не только, кстати, самих РНК, но и всех природных систем) обусловлена низлежащими структурами; то есть в конечном счёте – монадным восприятием.

Впрочем, как это часто бывает, дальнейшая интеграция первичных «цепочек жизни» в единый протогеном отнюдь не принесла им пользы. Ведь после опрометчивого внедрения в своё домашнее хозяйство усовершенствованных молекулярных роботов (гистонов) и последующей компактификации основного наследственного материала в виде ДНК они полностью, увы, лишились собственной свободы.

Таким образом, постоянно стремясь к чему-то новому, нуклеосомы невольно (как, в принципе, и любые системы вообще) тем самым закрыли дорогу своей эволюции, так как с появлением клетки они стали обслуживать потребности совсем уже иного коллектива. И тем не менее надо отметить, что кое-какие малые РНК всё же таки сумели остаться при главном командном штабе. Причем, вероятнее всего, они выполняли там ряд важных экстрасенсорных задач, а впоследствии стали влиять также и на циркадианную ритмику клеток (что, разумеется, напрямую связано с адекватным восприятием ими световой энергии). По крайней мере, совершенно очевидно, что периферические центриоли не могут играть решающую роль в процессах клеточного созревания и деления. Все нужные для этого команды они получают из ядра, где, соответственно, расположен и сам ритмоводитель. Хотя, с другой стороны, он при этом не может, конечно же, и быть всецело зависим от своих «штатных» хроматид (особенно если вспомнить, сколь демонстративно они упираются при растаскивании по разным полюсам).

Переходя теперь к общему предельно сжатому обзору эволюции многоклеточных организмов, уточним для начала, что именно на этом этапе возникает митоз, мейоз, конъюгация, диплоидия, полиплоидия и другие столь актуальные для нас процессы и формы развития. Но все же самым, пожалуй, ценным творческим успехом в этом плане следует, очевидно, признать приобретение в качестве своих будущих безотказных помощников одними нуклеосомами риккетсий (причем, как ни странно, зачастую уже нынче патогенных), ну и, соответственно, нитчатых цианобактерий – другими.

Со временем клетки стали объединяться в содружества, которые образовывались на основе деления одной материнской клетки – вследствие, надо полагать, адгезивности дочерних.

Хотя дальнейшее поступательное развитие различных земных видов имеет, конечно же, какие-то свои определенные особенности, но всё же таки осуществлялось оно по единому принципу



– на базе некоего конкретно взятого генома, утратившего ранее (т.е. на прежних, теперь уже как бы «архаических» ступеньках эволюции) способность к самоусовершенствованию. Ну и, кроме того, необходимо также здесь учитывать, что в раннюю земную эпоху (а тем более – при отсутствии тогда *еще* привычных для нас сальтаций) среди представителей растительно-животного царства сполна, судя по всему, практиковались еще и какие-то другие рычаги видового прогресса. И хотя многие из них кажутся нам сегодня весьма эффективными и логически, вроде бы, непротиворечивыми, однако же история, увы, решила почему-то в данном случае распорядиться иначе. А возможно, вовсе и не история даже, а общевселенская [8] ноосфера?..

Сказанное прежде всего касается авторской концепции энфорсогенеза, а также регенеративного, шагового и диффузного векторов эволюционного развития. Первая из них подразумевает, в частности, обязательное (и в этом ее коренное отличие от куда более мягкой ламарковской [9] формулировки) унаследование всех приобретенных родительских свойств прямыми жизнеспособными потомками. Что ж до трёх других «побочных» опций, то они будут рассмотрены ниже.

Вкратце говоря, сущность шагового принципа состоит в следующем: для того, чтобы произошёл хоть небольшой качественный скачок (независимо от его участка, вида ткани и т.п.), надо, чтоб на этом месте количество клеточных делений было как минимум на одно больше по сравнению с предыдущим поколением. Если же перейти конкретно к интересующему всех царству Metazoa, где самым актуальным для нас локусом является, конечно же, нервная ткань, – то именно к шаговой эволюции эктодермы (хотя, впрочем, в какой-то степени и мезодермы) должно быть, по идее, приковано основное наше внимание. При этом лишнее деление способно произойти, пожалуй, лишь в материнской утробе (ибо на свету нейроны не демонстрируют обычно особой митозной активности) – что, в свою очередь, может быть реализовано только при постепенном убыстрении /«сминании»/ начальных стадий развития плода. К слову, вариант, связанный с большей якобы продолжительностью самой по себе лунно-месячной декады, вряд ли здесь практически применим; особенно если есть возможность объяснить всё куда более проще: например, с позиций номогенеза [10, с.470] или же, скажем, разноуровневого понимания времени [11, с.8 – 12].

Таким образом, шаговый тип эволюции является, на первый взгляд, вполне приемлемым вектором не только для хордовых, но и для многих других нынешних или ископаемых видов, сколь-нибудь причастных к феномену постадийного развития (яйцо-личинка-куколка и т.п.). Судя по всему, примерно то же самое можно сказать и относительно растений, прорастающих из спор и семян [12, с.58 – 71]. И если природа не пошла по этому простому естественному пути – то данное обстоятельство можно рассматривать не иначе как дополнительный сильный аргумент против номо- и ортогенеза.

Почти все прогрессивные макро-скачки (как то: преобразование чешуи в перья, а плавников в конечности; создание коллективного разума у муравьев и пчел; радикальный отказ от хвоста и подготовка артикуляционного аппарата к осмысленной речи у доисторических гоминоидов) так или иначе связаны с направленным «вмешательством извне», адекватной трактовке которого автор посвятил в свое время целую книгу [13, с.69 – 78]. Так что в данной сокращенной версии статьи имеет, пожалуй, смысл остановиться лишь на некоторых более-менее очевидных фактах и обстоятельствах повседневного приспособительного усовершенствования организмов.

В современном научном сообществе как-то уж негласно утвердилась банальная, но вполне закономерная мысль, что все они происходят якобы благодаря избирательному метилированию генов (если не принимать здесь, правда, во внимание сугубо ламаркистских [9] идей). Что ж, для большинства земных видов, похоже, так оно и есть. А вот для книдарий, гребневиков и некоторых других беспозвоночных ведущим фактором их успешного выживания явилась – не исключено – диффузность нервной системы, позволяющая генеративной клетке знать об основных событиях, протекающих как внутри, так и вокруг, перенося затем накопленный опыт в новое поколение. В свою очередь, иглокожие имеют привычку размножаться посредством регенерации целой особи всего лишь из одного лучика, а это, по всей вероятности, также ведет к сохранению за потомком благоприобретенных родительских качеств. Что же касается типа членистоногих, то ни у одного земного организма не отлажено больше столь чёткого архисложного руководства всей системой со стороны первичной регуляторной хромосомы (что причём явственно проглядывает уже в ходе онтогенеза). Вспомним хотя бы в этой связи чрезвычайно пунктуальных, смекалистых и по-



своему даже умудрённым опытом общественных насекомых!.. А значит, они олицетворяют собою некий специфический вектор эволюционного развития, сумев при этом добраться почти до самых его вершин.

Наконец, известно, что плазмидно-эписомный перенос геномного материала [14, с.146] от одной клетки к другой играет значительную роль в жизни прокариот. Можно выдвинуть гипотезу, что и на более высоких стадиях развития растительного мира удастся зафиксировать подобные явления гомо- или даже гетеро-организменного переноса [15, с. 249-255]. Ведь, как уже было отмечено в начале, подселение в разные клетки качественно разных хлоропластовых и митохондриальных бактерий-симбионтов тоже, очевидно, сыграло немаловажную роль в плане развития коренных отличий между растительными и животными клетками. Сродни плазмидному переносу и феномен трансдукционной интеграции геномов [16, с.117 – 123], главными действующими лицами которого являются ретровирусы, живущие и размножающиеся на основе мирного сосуществования с более развитыми организмами.

Мутации принято считать слепым и малоэффективным фактором эволюции, хотя они тоже имеют определенную ценность и даже способны привносить некую свою информативную лепту в окружающий нас мир. Правда, вполне возможные поломки на субнуклеотидном уровне почему-то в нынешней научной литературе упоминаются весьма скудно (наверное, из-за слишком частого их естественного отсева). Хотя, судя по всему, именно такая вот ранняя глубокая мутация привела к возникновению 2-дезоксирибозы (а вместе с нею – и столь востребованных нынче ДНКовых суперспиралей).

\*\*\*

Последующие разделы полностью уже будут посвящены аналогичным динамическим процессам, протекающим в масштабах Вселенной.

А здесь пока, подытоживая все приведенные выше разнородные, а порой и весьма субъективные выкладки, так или иначе связанные с организменной эволюцией (ну и попутно как бы заранее упреждая всякие недружелюбные стрелы в свой адрес), хотелось бы акцентировать внимание на трёх самых важных краеугольных вехах авторского подхода, а именно:

а) *принципиальной возможности существенных анатомо-морфологических изменений на уровне особи (даже при жёстком струк-*

*турном постоянстве генома у любых её сколь-нибудь обозримых предков).*

б) *главенствующей роли факторов внутреннего саморазвития и естественного отбора как основных движущих сил прогресса.*

в) *вполне очевидной концептуальной автономии данных эволюционных постулатов от общего стохастического шума (мутаций); или же, проще говоря – формальной независимости этих двух направлений друг от друга.*

3. Наблюдения за ходом эволюции систем позволяют сформулировать нам закон чрезвычайного /синонимы: *перемежающегося, триадного/ подобия. Практическая его ценность в том, что он раскрывает горизонты познания, давая возможность проникать в такие сферы, которые пока ещё недоступны для целевых лабораторных исследований. Особенно это касается начальных этапов всеобщего природного развития, так как грядущее с его близкими к совершенству эволюционными макроструктурами, по идее, вполне прогнозируемо и с помощью иных, хорошо уже испытанных средств.*

Вкратце сущность закона перемежающегося подобия можно сформулировать так: каждая новая система появляется на свет из субъективных предшествующей ей системы согласно плану (или, если угодно, алгоритму), апробированному [17, с.596] [18] на иерархически еще более ранних ступенях. Именно речь идёт лишь об общем сценарии [19, с.306 – 308] построения, так как любая попытка узреть в ретроспективных био-конструктах некоего прямого предка ныне живущих видов будет выглядеть мистической и даже комичной. В частности, скажем, придется признать, что человеческая ДНК произошла от ванадия, а клетка – от какого-то его сложного водородного соединения наподобие гидрида. На самом же деле человеческая клетка имеет конкретное генетическое родство только с соответствующими хромосомами и митохондриями, но первые диплоидно удвоились в результате встречи и конъюгации двух гаплоидных клеток (т.е. по примеру образования двухатомных молекул простых веществ); а вторые присоединились по периферии подобно ионам водорода в молекуле этилена.

Сопоставляя указанный закон с теми или иными расхожими теориями [20], как, впрочем, и с феноменами, поддающимися непосредственному наблюдению, мы имеем возможность кое-что уточнить и корректировать в этих общепринятых ныне концепциях (особенно что касается структур и процессов, царящих в не-

доступном для нашего невооружённого глаза микромире). Так, например, мы можем с полной уверенностью подтвердить, что протон и нейтрон по числу и характеру составляющих их субчастиц действительно внешне мало чем отличаются друг от друга. Но вместе с тем, как всем известно, время жизни нейтрона в свободном состоянии несоизмеримо короче, чем у его ядерного «собрата»; а значит – главная загвоздка тут в неких специфических минус-факторах, усугубляющих горькую участь первых из них (либо – что, вообще говоря, куда менее реально – как-то «покровительствующих» вторым). И причем факторы эти наверняка уж являются «*adduxistis deforis*»; хотя, правда, данное обстоятельство может быть, кроме того, вызвано и неустойчивостью определённого сочетания монад (т.е. по сути дела – кварков) или же, допустим, их различным положением в пространстве. Однако если принять во внимание способность чудотворцев обходить (путём посылки волевых импульсов) законы гравитации, пренебрегая порой даже внутриядерными «сильными связями», то, пожалуй, придётся-таки в итоге согласиться с версией о лептонной природе подобных взаимодействий.

Далее, отчётливо видно, что каждая монада имеет по крайней мере три независимых характеристики, не считая межгендерной полярности, обуславливающей взаимное попарное притяжение между ними; что все они могут излучать и поглощать энергию; что взаимодействие между монадами в кварковых тройках на много порядков сильнее, чем их смежные связи в ядре.

Представляет известный интерес тот факт, что одни аналоги изотопного водорода сворачиваются в кольца, совершенно однозначно переходя при этом к сугубо созерцательному «*modus vivendi*»; другие же – линейные – характерными представителями которых являются всемогущие вирусы, ведут гиперактивный, чуть ли не пиратский образ жизни. Формальных причин здесь можно отыскать несколько: первые (кольцевые) ДНК входят в состав клеточных структур, у вторых же в этом плане достаточная самостоятельность. У них также отсутствуют, кстати, и гистоновые октамеры, что тоже способно повлиять на пространственную конфигурацию и основные характеристики вирусных кислот. Но истинная причина, как правило, одна – и вот она-то как раз от нас и скрыта.

Кстати, нематоды, геномы которых построены аналогично простейшим водородным

молекулам, процветают во всех частях света и в любых средах, но, как и сами эти молекулы, они тоже, увы, не вечны. То есть определённые специфические особенности строения как субатомных, так и субмолекулярных структур обязательно должны здесь присутствовать. Ибо трудно поверить, что замыкание ДНК в кольцо (у бактерий, архей, сине-зеленых водорослей, а также у современных пластид) могло быть связано только с переходом к клеточной форме существования [21, с.194-201]. В этой связи отмечу, что характер межнуклеотидных контактов в митохондриях является хотя и далёким, но абсолютно верным аналогом круговой поруки, панибратства, легкого доступного секса и тому подобной относительной разупорядоченности, имеющей место во многих неформальных религиозных общинах. Не говоря уже об основной функции любых образований такого рода – активном поглощении неисчерпаемой животворной энергии [22] [23, с.16] из окружающего космоса.

4. Итак, в качестве главной причины естественного видового полиморфизма с точки зрения имеющихся у нас научных данных следует полагать именно прогрессивное саморазвитие особей с эпизодическим (но всё же довольно-таки редким) подстёгиванием указанного процесса извне.

Ну а можно ли попытаться что-либо противопоставить этому – пускай даже с элементами здравой фантазии? Что ж, такие варианты формально в нашем распоряжении тоже имеются. Во-первых, это придание самодовлеющей, чуть ли не мистической организационной роли белкам, самостоятельно якобы перестраивающим собственную компьютерно-управленческую сеть, – что в свою очередь непосредственно увязывается с адекватным запуском сложнейшего механизма онтогенеза. В подобного рода идею любому трезвомыслящему ученому поверить, конечно, нелегко, но – тем не менее...

Вторая альтернативная версия выглядит в этом плане куда привлекательней. Речь идёт о передаче роли активно действующего эволюционного субъекта от банально-общепризнанного организменного фактора самому по себе вселенскому времени [12, с.12 – 26], по отношению к которому жизнь в этом случае автоматически займёт позицию атрибута первого порядка. Что же касается истинного (т.е. не связанного с пространством) времени, то оно в данной ситуации, как легко заметить, уподо-

бляется единому божественному началу. Но это уже не тот слепой схоластический подход к трактовке понятия «Аллах» [24, с. 57], который так хорошо знаком многим ещё, можно сказать, с самого детства, а более-менее всё же таки научно обоснованный [25]! Кстати, добавим попутно, что столь же привычное для нас время движения, связанное с преодолением (а иногда – у чудотворцев – и преобразованием) пространства, относится к истинному, как функция к аргументу,

К сожалению, однако, обе рассмотренные только что версии не являются для нынешней науки достаточно актуальными – хотя бы просто потому, что их, по-видимому, в принципе невозможно ни подтвердить, ни опровергнуть. Креационистская позиция с этой точки зрения, как-никак, методологически более приемлема, так как высших эволюционных иерархов со временем инструментальным путём можно будет, по идее, обнаружить [8]. Да и, кроме всего прочего, только эта концепция помогает разрешить извечный философский вопрос «В чём же всё-таки состоит вселенский смысл нашей явно бессмысленной жизни?» И, как ни печально, ответ тут поневоле напрашивается однозначный: в прислуживании высшим иерархам!

## Заключение

Итак, видимый природный полиморфизм отнюдь не сводится – следуя авторскому мировосприятию – к простейшим неodarвинистским конструкциям [2]; [3], а предполагает обязательное привлечение в качестве провоцирующего фактора так называемое «вмешательство извне». Но тем не менее бесспорная основополагающая роль эволюционного начала [26] всё равно проглядывает буквально на каждом шагу. Это и весьма замысловатая генеалогия прионов, и микроэволюционные сдвиги, происходящие, кстати сказать, у всех у нас на глазах (нашествия невиданных ранее комаров и крыс; образование новых штаммов резистентных к лекарствам и ядам бактерий; выведение селекционерами ценных культурных сортов и пород), ну и в конце концов даже пресловутые расовые различия людей, которые, судя по всему, лучше других сумел как раз объяснить отвергнутый потом чуть ли не всем учёным миром Ж.-П. Ламарк.

Так что всеобщая мультифазная эволюция – прежде всего, а креационизм допустимо рассматривать, по идее, лишь как одно из вполне эффективных её вспомогательных средств.

## Литература

- 1 Аль-Фараби: «Естественнонаучные трактаты» // Алма-Ата, 1987.
- 2 А. Р. Уоллес: «Дарвинизм. Изложение теории естественного подбора» // Москва. – 1911.
- 3 А. Вейсман: «Лекции по эволюционной теории» // С-Пб. -1918.
- 4 В.С. Лукьянец: «Наука нового века: гуманитарные трансформации» // Киев, изд. «Парапан», 2008 г.
- 5 V.S. Lukianets: “Science of the new century: humanitarian transformations” В.С. Крисаченко, В.С. Лукьянец: “Естественнонаучное мышление и современность” // Киев, изд. «Наукова думка», 1989 г.
- 6 V.S. Kryshchenko, V.S. Lukianets: “Natural-science thinking and modernity” Э.Э. Ашшурский: «Вириссимология» (цикл статей) // журнал «Невероятный мир», № 9 – 12, 1995 г., С-Пб.
- 7 Э.Э. Ашшурский: «Всё новое начинается с проекта» //ежегодный альманах «София», Киев, изд. «Феникс», 2005 г.
- 8 Г. В. Чепранов: «Бог. Вселенная. Человек» //Таганрог, изд. ТРТИ, 1992 г.
- 9 J.– B. de Lamarck: “Philosophie Zoologique” //Paris, p/h “Muséum national d’histoire naturelle”, 1809.
- 10 Lev S. Berg: “Nomogenesis, or Evolution determined by law” //Cambridge (USA), p/h “M.I.T. Press”, 1969
- 11 Л.С. Берг: «Номогенез, или эволюция на основе закономерностей» Э.Э. Ашшурский: «Сквозь призму философского анализа» //Киев, изд. «Пам’ятки України», 1998 г.
- 12 Emir E. Ashursky: «Through the prism of philosophical analysis» Э.Э. Ашшурский: “Опыт философского осмысления противоречий современной науки” // Киев, изд. «Эсперанца», 1994 г.
- 13 Emir E. Ashursky: “The experience of philosophical comprehension of the contradictions of modern science» Э.Э. Ашшурский: «Философия в поисках и находках» //Киев, изд. «Эсперанца», 1997 г.
- 14 Emir E. Ashursky: «Philosophy in search and finds» V.A. Kordyum et al.: «Transfer of genetic information in an organism» // See sci. collection: “Abstracts of I Ukrainian congress for cell biology”, Lviv, April 25-28, 2004
- 15 В.А. Кордюм: “Эволюция и биосфера” // Киев, изд. «Наукова думка», 1982. V. A. Kordyum: «Evolution and biosphere» – Kyiv: p/h «Naukova dumka», 1982
- 16 В.А. Кордюм: “Информационные потоки в биосфере” //Киев, изд. «Академперіодика», 2016. V. A. Kordyum: «Information flows in biosphere» – Kyiv, p/h «Academperіodika», 2016
- 17 P. Courtois: “On time and space decomposition of complex structures” – New York, journal “Communications of the ACM”, vol. 28(6), 1985

- 18 Grady Booch: “Object-oriented Analysis” – Boston /USA/, publishing company “Addison Wesley”, 2007
- 19 А.М.Уголев: «Естественные технологии биологических систем»// Ленинград, изд. «Наука», 1987 г.
- 20 В. Т. Ивашкин, Г. А. Минасян, А. М. Уголев: «Теория функциональных блоков»// Ленинград, изд. «Наука», 1990
- 21 David G. Green: “Connectivity and complexity in ecological systems” – Melbourne /Australia/, journal “Pacific Conservation Biology”, vol. 1(3), 1994
- 22 Eric Chaisson: “Cosmic evolution: the rise of complexity in nature” – Harvard Univ. /USA/, p/h “Press”, 2001.
- 23 Eric Chaisson: “Rhythm of the cosmos: finding unity among the natural sciences” – Medford /USA/, journal “Tufts Magazine”, Spring, 2001.
- 24 Reisman K. David (editor): “Before and after Avicenna” – Princeton Univ., New Jersey /USA/, 2001
- 25 Н.А. Назарбаев: “Мы официально признаем Ислам и гордимся этим фактом!” (видеоинтервью) // Доступ по эл. ресурсу: <https://www.youtube.com/watch?v=J20GOJQDSQQ>
- 26 Карл Саган: “Эволюция Вселенной, жизни и цивилизации” // С-Пб., изд. «Амфора», 2005 г.

### References

- 1 Al’-Farabi: «Estestvennonauchnye traktaty» // Alma-Ata, 1987.
- 2 A. R. Uolles: «Darvinizm. Izlozhenie teorii estestvennogo podbora» // Moskva, 1911
- 3 A. Vejsman: «Lekcii po evolyucionnoj teorii» // S-Pb., 1918
- 4 V.S. Luk’yanec: «Nauka novogo veka: gumanitarnye transformacii» // Kiev, izd. «Parapan», 2008 g.
- 5 V.S. Lukianets: “Science of the new century: humanitarian transformations” V.S. Krisachenko, V.S. Luk’yanec: “Estestvennonauchnoe myshlenie i sovremennost” // Kiev, izd. «Naukova dumka», 1989 g.
- 6 V.S. Krysachenko, V.S. Lukianets: “Natural-science thinking and modernity” E.E. Ashshurskij: “Virissimologiya” (cikl statej) //zhurnal “Neveroyatnyj mir”, № 9 – 12, 1995 g., S-Pb.
- 7 E.E. Ashshurskij: «Vsyo novoe nachinaetsya s proekta» //ezhegodnyj al’manah «Sofiya», Kiev, izd. «Feniks», 2005 g.
- 8 G. V. CHEfranov: «Bog. Vselennaya. CHElovek» //Taganrog, izd. TRTI, 1992 g.
- 9 J.– B. de Lamarck: “Philosophie Zoologique” //Paris, p/h “Muséum national d’histoire naturelle”, 1809.
- 10 Lev S. Berg: “Nomogenesis, or Evolution determined by law” //Cambridge (USA), p/h “M.I.T. Press”, 1969
- 11 L.S. Berg: «Nomogenez, ili evolyuciya na osnove zakonomirnostej» E.E. Ashshurskij: «Skvoz’ prizmu filosofskogo analiza» //Kiev, izd. «Pam’yatki Ukraïni», 1998 g.
- 12 Emir E. Ashursky: “Through the prism of philosophical analysis” E.E. Ashshurskij: “Opyt filosofskogo osmysleniya protivorechij sovremennoj nauki” // Kiev, izd. «Esperanca», 1994 g.
- 13 Emir E. Ashursky: “The experience of philosophical comprehension of the contradictions of modern science” E.E. Ashshurskij: «Filosofiya v poiskah i nahodkah» //Kiev, izd. «Esperanca», 1997 g.
- 14 Emir E. Ashursky: “Philosophy in search and finds” V.A. Kordyum et al.: «Transfer of genetic information in an organism» // See sci. collection: “Abstracts of I Ukrainian congress for cell biology”, Lviv, April 25-28, 2004
- 15 V.A. Kordyum: “Evoluciya i biosfera” // Kiev, izd. «Naukova dumka», 1982. V. A. Kordium: «Evolution and biosphere» – Kyiv: p/h «Naukova dumka», 1982
- 16 V.A. Kordyum: “Informacionnye potoki v biosfere” //Kiev, izd. «Akademperiodika», 2016. V. A. Kordium: «Information flows in biosphere» – Kyiv, p/h «Academperiodika», 2016
- 17 P. Courtois: “On time and space decomposition of complex structures” – New York, journal “Communications of the ACM”, vol. 28(6), 1985
- 18 Grady Booch: “Object-oriented Analysis” – Boston /USA/, publishing company “Addison Wesley”, 2007
- 19 A.M.Ugolev: “Estestvennye tekhnologii biologicheskikh sistem”// Leningrad, izd. «Nauka», 1987 g.
- 20 V. T. Ivashkin, G. A. Minasyan, A. M. Ugolev: “Teoriya funkcional’nyh blokov”// Leningrad, izd. «Nauka», 1990
- 21 David G. Green: “Connectivity and complexity in ecological systems” – Melbourne /Australia/, journal “Pacific Conservation Biology”, vol. 1(3), 1994
- 22 Eric Chaisson: “Cosmic evolution: the rise of complexity in nature” – Harvard Univ. /USA/, p/h “Press”, 2001.
- 23 Eric Chaisson: “Rhythm of the cosmos: finding unity among the natural sciences” – Medford /USA/, journal “Tufts Magazine”, Spring, 2001.
- 24 Reisman K. David (editor): “Before and after Avicenna” – Princeton Univ., New Jersey /USA/, 2001
- 25 N.A. Nazarbajev: “My oficial’no priznaem Islam i gordimsya etim faktom!” (videointerv’yu) // Dostup po el. resursu: <https://www.youtube.com/watch?v=J20GOJQDSQQ>
- 26 Karl Sagan: “Evoluciya Vselennoj, zhizni i civilizacii” // S-Pb., izd. «Amfora», 2005 g.

Ibrahim A. Abdelazim<sup>1</sup> , A. Adilgereeva<sup>2\*</sup> , G. Zhurabekova<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Ain Shams University, Egypt, Cairo; Ahmadi hospital, Kuwait Oil Company (KOC), Kuwait, Ahmadi

<sup>2</sup>West Kazakhstan Marat Ospanov Medical University, Kazakhstan, Aktobe

<sup>3</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: a.adilgereeva@mail.ru

## STRUCTURE AND FUTURE PROSPECTIVE OF MATRIX METALLOPROTEINASES

Matrix metalloproteinases (MMPs) are group of enzymes responsible for the collagen, and protein degradation in extracellular matrix (ECM). Collagen is the main structural component of connective tissue, and its degradation is an important process in the tissue development, remodeling, and repair. MMP family is divided into 6 groups: collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMPs, and non-classified MMPs. The MMPs, and MMP inhibitors (MMPI) have multiple biological functions in stages of cancer development. MMPs, and MMPI are extensively examined as potential anticancer medications. The need for selective and metabolically stable MMPs and MMP inhibitors determined the effect of their activity on biological systems. In particular, the relationship of MMPs with the immune system has revealed the potential for the use of MMP inhibitors in therapy. As is known, the degree of invasive growth and metastasis of tumor cells are determined by their ability to cleave all ECM structures of the extracellular matrix – only MMPs can do this. It is important to note that ECM affects the behavior of both cancer cells and stromal, endothelial and immune cells in the environment. The fundamentally important role of ECM is dynamism during tissue homeostasis and the ability to regulate the activation of immune cells.

**Key words:** Structure, Prospective, Matrix Metalloproteinases, MMPs.

Ibrahim A. Abdelazim<sup>1</sup>, А. Адилгереева<sup>2\*</sup>, Г. Журабекова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Айн-Шамс университеті, Каир, Египет және Ахмади ауруханасы,  
Кувейт мұнай компаниясы (КМК), Кувейт, Ахмади қ.

<sup>2</sup>Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медицина университеті, Қазақстан, Ақтөбе қ.

<sup>3</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: a.adilgereeva@mail.ru

### Матрицалық металлопротеиназалардың құрылымы мен даму перспективалары

Матрицалық металлопротеиназалар (ММП) – жасушадан тыс матрицада (ЖТМ) коллаген мен ақуыздың бөлінуіне жауапты ферменттер тобы. Коллаген дәнекер тінінің негізгі құрылымдық құрамдас бөлігі болып табылады және оның деградациясы тіндердің дамуындағы, қайта қалыптасуы және қалпына келуіндегі маңызды процесс болып табылады. ММП түрлері 6 топқа бөлінеді: коллагеназдар, желатиназалар, стромелизиндер, матрилизиндер, мембраналық ММП және жіктелмеген ММП. ММП және ММП ингибиторлары (ММПИ) қатерлі ісік сатысында бірнеше биологиялық функцияға ие. ММП-лар және ММПИ потенциалды ісікке қарсы препараттар ретінде кеңінен зерттелуде. Селективті және метаболикалық тұрақты ММП және ММП ингибиторларының қажеттілігі олардың белсенділігінің биологиялық жүйелерге әсерін анықтады. Атап айтқанда, ММП иммундық жүйемен байланысы терапияда ММП ингибиторларын қолдану әлеуетін анықтады. Белгілі болғандай, ісік жасушаларының инвазиялық өсу дәрежесі және метастазы олардың жасушадан тыс матрицаның барлық ЭКМ құрылымдарын ыдырау қабілетімен анықталады – мұны тек ММП ғана жасай алады. ЕСМ рак клеткаларының, сондай-ақ қоршаған ортадағы стромальды, эндотелиальды және иммундық жасушалардың мінез-құлқына әсер ететіндігін атап өту маңызды. ЭКМ-нің маңызды рөлі – тіндік гомеостаз кезіндегі динамизм және иммундық жасушалардың активтенуін реттеу мүмкіндігі.

**Түйін сөздер:** құрылым, перспектива, матрицалық металлопротеиназалар, ММП.

Ibrahim A. Abdelazim<sup>1</sup>, А. Адилгереева<sup>2\*</sup>, Г. Журабекова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Университет Айн-Шамс, Египет, г. Каир; Больница Ахмади,  
Кувейтская нефтяная компания (КОК), Кувейт, г. Ахмади

<sup>2</sup>Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова, Казахстан, г. Актобе

<sup>3</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: a.adilgereeva@mail.ru

### Структура и перспективы развития матриксных металлопротеиназ

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – это группа ферментов, ответственных за расщепление коллагена и белка во внеклеточном матриксе (ЭКМ). Коллаген является основным структурным компонентом соединительной ткани, и его деградация представляет важный процесс в развитии, ремоделировании и восстановлении тканей. Семейство ММП делится на 6 групп: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, мембранные ММП и неклассифицированные ММП. ММП и ингибиторы ММП (ММПИ) имеют несколько биологических функций на стадиях развития рака. ММПs и ММПИ широко изучаются как потенциальные противоопухолевые препараты. Необходимость селективных и метаболически стабильных ММП и ингибиторов ММП определили влияние их активности на биологические системы. В частности, взаимосвязь ММП с иммунной системой выявила потенциальные возможности применения ингибиторов ММП в терапии. Как известно, степень инвазивного роста и метастазирование опухолевых клеток определяются их способностью расщеплять все структуры ЭКМ экстраклеточного матрикса – это могут только ММП. Важно отметить, что ЕСМ влияет на поведение как раковых клеток, так и стромальных, эндотелиальных и иммунных клеток окружающей среды. Фундаментально важная роль ЕСМ – динамичность во время гомеостаза тканей и способность регулировать активность иммунных клеток.

**Ключевые слова:** структура, перспектива, матриксные металлопротеиназы, ММП.

#### Abbreviations

MMPs – matrix metalloproteinases; ECM – extracellular matrix; ММПИ- matrix metalloproteinases inhibitors; UVR – ultraviolet radiation; TNF – tumor necrosis factor; TGF –transforming growth factor; EGF – epidermal growth factor; PDGF – platelet-derived growth factor; FGF – fibroblast growth factor; VEGF – vascular endothelial growth factor; EMT – epithelial to mesenchymal transition.

#### Introduction

The main function of the extracellular matrix (ECM) is to maintain tissues mechanical, and biochemical specific properties. The tissue building cells are responsible for the synthesis of ECM components, and ECM has direct impact on the cell function [1].

Cell-matrix interactions occur due to the presence of specific receptors located on the matrix molecules, and on the surface of binding cell. The receptors play a dominant role in cells connection, migration, regulation of the cell's differentiation, and proteins expression. Pericellular matrix creates a physiological micro-environment for the cell protection against harmful, physical factors, and facilitates the transmission of signals [2]. Collagen is the main structural component of connective tissue;

it maintains the organs stability and support their structural integrity. The collagen, and collagen-degrading enzymes family are characterized by a repeated tripeptide domain rich in proline, which is necessary to form a triplet-helix of collagen. This group of proteins is responsible for ECM formation [3]. The molecular structure, and metabolism of various collagen in tissues is important to understand the process of the embryo development, and pathogenesis human diseases. In addition, the expression and function of various types of collagen allow better understanding diseases that result from the molecular defects in the gene encoding different collagen structure (including osteogenesis imperfecta, Alport, and Ehlers-Danlos syndrome, and epidermolysis bullosa). The disorders of collagen metabolism occurs in osteoarthritis, osteoporosis, and oncogenesis. The properties of different collagen, and enzymes that participate in collagen degradation is important for possible therapeutic use [4]

#### Collagen degradation

The degradation of collagen as one of ECM components is important process in the development of diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, nephritis, chronic ulcers, and fibrosis. The ECM degradation involves different types of proteases, and matrix metalloproteinase (MMPs) called *matrixins*

are the major group of proteases [5]. They belong to group of endopeptidases, whose enzymatic activity is determined by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions.

The first enzyme identified in this group was collagenase-1 (now referred to MMP-1), discovered by **Gross and LaPiere** in the tissue material from the tail of a tadpole of North American frog species [6]. Till now there are 24 known MMPs identified (23 in humans). Common classification distinguishes several MMPs, starting with MMP-1, and ending with MMP-28, but it does not include MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-22. MMPs are involved in trophoblast implantation, embryogenesis, bone growth, angiogenesis, wound healing, and tissue regeneration. The expression of MMPs' genes is observed in the connective tissue, fibroblasts, neutrophils, monocytes, macrophages, and endothelial cells [7]. The biological activity of MMPs is regulated at the level of gene transcription, mRNA half-life modulation, regulation of secretion by cells, pro-enzymatic activation, inhibition of active enzymes, and enzyme activation.

MMPs are also subjected to neuro-immuno-hormonal control. The expression of MMPs is maintained in the tissues at a low level. Regulation of MMPs transcription at the cellular level is influenced by growth factors, cytokines, hormones, cell-cell interaction, and physical factors such as ultraviolet radiation (UVR). Factors that increase MMPs expression are inflammatory cytokines (interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor (TNF)), hormones and growth factors (transforming growth factor (TGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and fibroblast growth factor (FGF)). The expression of MMP inhibitors (MMPI) influenced by corticosteroids, retinoic acid, heparin, and interleukin 4. MMPs are directly activated by proteases (plasmin, trypsin, and elastase), and certain metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9). Membrane-MMPs (MT-MMPs) are responsible for

local activation of the inactive enzyme. In plasma, the largest part of the protease inhibitors are  $\alpha 1$ -antiprotease, and  $\alpha 2$ -macroglobulin. TIMPs may inhibit the active MMP and/or inhibit the activation of the pro-MMP into active MMP. The expression of TIMP is regulated by the growth factors, and cytokines [7].

### MMPs structure

MMPs are ECM proteins, although some of them (MMP-1, MMP-2, and MMP-11) are found within cells, and their activity toward to the intracellular proteins has been confirmed as well.

MMP consists of several distinct domains. *predomain*, *propeptide*, *catalytic*, and *hemopexin domains*. Figure 1

*Predomain* absent in MT-MMPs. *Propeptide domain*, which usually consists of 80 AAs, contains highly conserved sequence PRCGVPDV. *Catalytic domain* consists of 170 AAs, and contains a three-histidine sequence, which is required for zinc chelation. A typical MMP contains a linker peptide (*hinge region*) of variable length, and *hemopexin domain* of 200 AAs, which is required for interactions with other MMPs, and TIMP [1]. MMP-7 (matrilysin-1), MMP-23, and MMP-26 (matrilysin-2) do not have *hinge region* and *hemopexin domain*.

MMP-23 has a unique cysteine-rich, and immunoglobulin domains. For MMPs activity, they require zinc ion in catalytic site, and proteolytical activation because they are secreted in an inactive form (pro-MMPs) [8].

### MMPs family

On structure basis and substrate specificity, MMPs were divided into six groups including collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMPs (MT-MMPs), and other non-classified MMPs [1]. Table 1 and Figure 2.

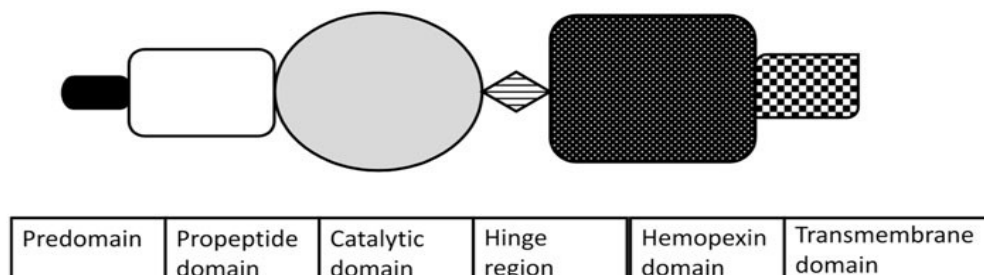


Figure 1 – Matrix Metalloproteinases structure

**Table 1** – Matrix Metalloproteinases (MMPs) family

| MMPs            | Numerical classification | Biological effect  |
|-----------------|--------------------------|--|
| Collagenase-1   | MMP-1                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ The migration of keratinocytes, re-epithelialization.</li> <li>▪ Cell migration, and proliferation.</li> <li>▪ Platelet aggregation.</li> <li>▪ Pro-inflammatory effect.</li> <li>▪ Cancer progression.</li> <li>▪ Proteolytic activity, degrade physical barriers.</li> </ul>  |
| Collagenase-2   | MMP-8                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ The activation of osteoclasts.</li> <li>▪ Enhancement of collagen affinity.</li> <li>▪ Anti-inflammatory activity.</li> <li>▪ Cancer progression.</li> <li>▪ Cleavage of chemokines and regulation of their mobilization.</li> </ul>  |
| Collagenase-3   | MMP-13                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ In cancer progression and induction and cell migration.</li> </ul>  |
| Gelatinase A    | MMP-2                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Growth of axons, cell migration, and proliferation.</li> <li>▪ The differentiation of mesenchymal cell.</li> <li>▪ Increase in the bioavailability of TGF.</li> <li>▪ Neuronal apoptosis leading to neurodegeneration.</li> <li>▪ Cancer progression.</li> <li>▪ Cleavage of IGF binding proteins, proliferation.</li> </ul>                        |
| Gelatinase B    | MMP-9                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Collagen affinity enhancing, and tumor cell resistance.</li> <li>▪ Pro-inflammatory and anti-inflammatory activity.</li> <li>▪ Chondrocyte apoptosis and incorporation of new osteoblasts.</li> <li>▪ Cancer progression.</li> <li>▪ Activation of TGF.</li> </ul>  |
| Stomelysin-1    | MMP-3                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Migration of cells, and epithelial cells apoptosis.</li> <li>▪ Epithelial-mesenchymal conversion.</li> <li>▪ Angiostatin-like elements generation.</li> <li>▪ Cell proliferation, pro and anti-inflammatory activity.</li> <li>▪ In cancer progression.</li> <li>▪ Upregulation of angiogenesis.</li> </ul>   |
| Stomelysin-2    | MMP-10                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ In cancer progression</li> <li>▪ Degradation of collagen.</li> <li>▪ Generation of endostatin, and angiostatin.</li> </ul>  |
| Stomelysin-3    | MMP-11                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ In cancer progression.</li> <li>▪ Release of <math>\alpha 1</math>-proteinase inhibitor.</li> <li>▪ Decrease cancer cell sensitivity to NK cells.</li> </ul>  |
| Matrilysin-1    | MMP-7                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adipocyte differentiation.</li> <li>▪ Collagen affinity enhancement.</li> <li>▪ Increase the bioavailability of IGF and TGF.</li> <li>▪ Cell differentiation, and abnormal cell aggregation.</li> <li>▪ Increase cells invasiveness.</li> <li>▪ Pro-inflammatory activation of osteoclasts.</li> <li>▪ Vasoconstriction and cell growth.</li> </ul> |
| Metalloelastase | MMP-12                   |  |
| Matrilysin-2    | MMP-26                   |  |
| MT-MMP          | MMP-14                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Anti-inflammatory</li> <li>▪ Epithelial cell migration, and adhesion reduction.</li> <li>▪ Trailers embryo to the uterine epithelium.</li> </ul>  |
| MT-MMP 2        | MMP-15                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adhesion and cell flatterring reduction</li> </ul>  |
| MT-MMP 3        | MMP-16                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adhesion and cell flatterring reduction</li> </ul>  |
| MT-MMP 4        | MMP-17                   |  |
| MT-MMP 5        | MMP-24                   |  |



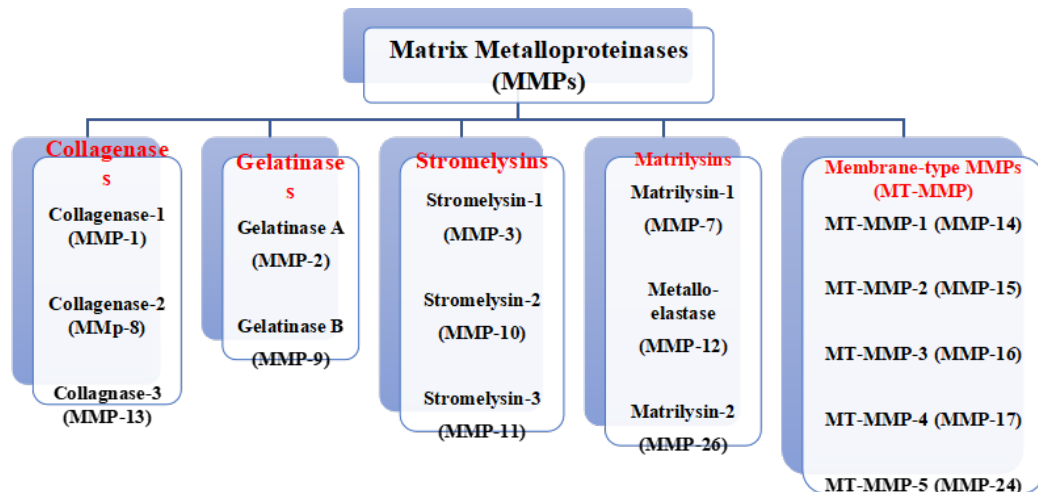


Figure 2 – Matrix Metalloproteinases (MMPs) family

### MMPs and cancer

Interactions of the cells with ECM are important for pathological changes occurring during cell transformation, and carcinogenesis. Some ECM proteins affect the tumor through their effect on cell migration or angiogenesis. MMPs were associated with metastasis facilitation by breakdown of ECM physical barriers. However, now it is confirmed that they have multiple biological functions in all stages of cancer, from initiation to outgrowth of clinical metastases [9]. MMPs are connected with cancer cells survival, expansion, and they are synthesized by cancer cell in small amount. Cancer cells stimulate surrounding host cells to produce required MMPs. MMPs secreted by normal cells can bound to cancer cell surface and used by them [10].

### MMPs influence on tumor growth

Several different mechanisms by which MMPs regulate the growth of cancer cells including release of cell membrane bound growth factors, modulation of bioavailability of growth factors, and indirect regulation of proliferative signals by integrins. MMPs may also inhibit tumor growth through TGF- $\beta$  activation and/or stimulation of pro-apoptotic molecules production [11].

The degradation of ECM by different MMP members not only removes the physical barriers for growing tumor, but also releases a biologically active molecules, and reveals the hidden sites in the ECM. Especially the invasive cancer cell can find the *actin-rich protrusions* of the plasma membrane associated with ECM degradation, called *invadopodia*. Soluble MMPs attach to adhesive molecules such as integ-

rins located on the surface of *invadopodia*. MMPs degrade different ECM ingredients, releasing various types of molecules affecting cells behavior [12]. One of the major factors connected with tumor growth is TGF $\beta$ . Which is released after fibronectin degradation by MMP-9. In normal epithelial, and cancer cells at an early stage of tumor growth, TGF- $\beta$  causes an inhibition of cell proliferation. It was observed, that 85% of all human cancers become resistant to the TGF- $\beta$  inhibitory effect on proliferation [13]. Many growth factors are connected to the cell surface in inactive form, and the MMPs are responsible for growth factors activation. MMPs release TNF- $\alpha$ , one of the most important pro-inflammatory cytokines that is expressed as a membrane bound precursor (pro-TNF- $\alpha$ ) on the macrophages, and T-cell surface. TNF- $\alpha$  promotes the survival of tumor cells [14]. MMPs interact with integrin, and cadherins (cell adhesion molecules), which belongs to cell surface receptors group present on the surface of the neighboring cells or in ECM. Receptors on cell surfaces belong to a five major classes: integrin, cadherin, immunoglobulin (Ig-CAMs) family, selectins, and CD44 receptors. Tumor cells have an increased number of CD44 isoforms. CD44 receptors bind to MMP-9, and the resulting complex involved in the type IV collagen degradation. Activation of MMP-9 with CD44 produces changes in tumor angiogenesis, and invasiveness. In contrast, MT1-MMP is involved in the degradation of CD44, and promotion of cell migration [15].

### MMPs influence on apoptosis

MMPs lead to apoptosis by cleaving adhesion molecules. MMP-3 induces apoptosis in case of its over-expression in epithelial cells [16].

### MMPs influence on angiogenesis

Angiogenesis is a process of development of new blood vessels from the existing blood vessels. MMP2, MMP9, and MMP14 may stimulate or inhibit the angiogenesis process [17]. MMPs promote angiogenesis in basement membrane, and ECM components degradation. The basement membrane disruption allows the migration of endothelial cells from existing vessels to the newly created. MMPs stimulates angiogenesis through VEGF (vascular endothelial growth factor). VEGF is mitogen factor specific for endothelial cells, that stimulates formation of new blood vessels from preexisting blood vessels [1]. On the other hand, MMPs can also inhibit the process of angiogenesis by releasing angiostatin caused by plasminogen cleavage, and by endostatin production caused by collagen cleaving. Especially MMP-2, MMP-7, MMP-9, and MMP-12 are capable of plasminogen digestion, and angiostatin releasing. However, endostatin, which is produced under the influence of MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13, and MMP-20, creates stable complexes with pro-MMP-9 and MMP-13, and blocs their activation [18]. The major role in angiogenesis played by MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP [19].

### MMPs role in invasion and metastasis

The process of metastasis is a multistage mechanism, starting from losing the intercellular connections, ECM degradation, and releasing of single cells of the tumor through *anoikis prevention*, cell migration, penetration into the blood or lymphatic, adhesion to endothelial cells, and finally a secondary growth in the new location [20]. *Anoikis* is an epithelial to mesenchymal transition (EMT). In this process, epithelial cells change their phenotype from epithelial to mesenchymal with loss of their integrity. One of the main inducers of EMT is TGF- $\beta$ , which is activated by MMPs. The cells of mesenchymal phenotype produce more MMPs which increasing their ability to metastasize. After moving to the metastatic locations, cancer cells can return to their original epithelial phenotype [21]. Two ways for cancer cell migration were described: moving of single cell or moving as a group of cells. During group of cell movement, cells connections are preserved, however when cells migrate individually, they move in a way that's called "*mesenchymal*" or "*amoeboidal*". Mesenchymal type of migration occurs after phenotype change form epithelial to mesenchymal cells. MMP involved in this pro-

cess, and limited to connecting, and disconnecting phases of mesenchymal type of migration. During single cells migration, MMPs are involved with adhesion molecules on the cell surface. MMPs digest the ECM components, and therefore facilitate the movement of cells [1].

### MMPs inhibition strategies as an anticancer target

MMPs play an important role in all stages of tumor progression including migration of tumor cells, escape from apoptosis, and immune surveillance, metastasis, and angiogenesis. The drugs with better antitumor activity should had specific inhibitors to MMPs members which has the pro-cancerogenic properties. The MMPs play a major role in the early stages of tumor growth suppression, and it could lead to tumor growth inhibition, and degradation. In contrast, in the fully formed, and vascularized tumor, the MMP activity is not critical. This may explain the lack of good results of therapy using MMPI, in advanced stages of cancer. The effect of MMP varies depending on the tumor type and/or stage of tumor [22]. The obvious relation between MMPs activity, and cancer development suggests the possibility of blocking of MMPs enzymatic activity. There are three main strategies of MMPs inhibition: at the level of transcription, activation, and inhibition.

At the transcription level, the MMPs inhibition can be achieved by extracellular factors (MMPs transcription can be inhibited by interferon), and by blocking transduction pathways. The next important issue in MMPs activity regulation is their activation because they are secreted as inactive enzyme form (pro-MMPs). This explains the role of anti-MMPs monoclonal antibodies as an effective MMP inhibitors. Active MMPs can be inhibited by exogenous, and endogenous factors, such as specific TIMMP or nonspecific  $\alpha$ -2 macroglobulin [23]. The MMPI can be divided into synthetic, and natural inhibitors. Selected synthetic inhibitors are in clinical trials in human (synthetic peptides, non-peptidic molecules, chemically modified tetracyclines, and bisphosphonates). Peptidomimetic MMPI are pseudopeptide derivative, act as a competitive inhibitor that inhibit MMPs activity mainly by interacting with  $Zn^{2+}$  ions in catalytic sites of MMPs.

Hydroxypyrones are alternative zinc binding groups (ZBGs) that combine with peptidomimetic forming a novel class of MMPI (Batimastat (BB-94), Marimastat (BB-2516), Prinomastat (AG-3340), and Tanomastat (BAY12-9566). The other

category of MMPI include the chemically modified tetracyclins (Metastat (COL-3, CMT-3), Minocycline, and Doxycycline). It inhibits MMPs by binding to zinc ions, and it entered phase II trials for Kaposi's sarcoma. Doxycycline is currently the only FDA officially approved MMPI for the prevention of Periodontitis [24].

Bisphosphonates besides their inhibition of the osteoclast activity, and bone resorption, it also inhibit selected MMPs activity. Bisphosphonates influence the protein expression of several MMPs, and TIMPs in breast cancer. Letrozole which is a nonsteroidal aromatase inhibitor, inhibits the gelatinases (MMP-2 and -9) released by breast cancer cells, and limits metastatic potential [25].

Genistein (soy isoflavonoid) is a natural substance with anticancer properties, it interferes with the expression of several MMPs, and TIMPs [26].

### Relationship of MMPs with ovarian cancer

**MMP-1** is the commonest expressed enzyme among the members of MMPs family. It is widely found in mesenchymal, epithelial, and endothelial cells. Overexpression of MMP-1 has been implicated in various malignant tumors and linked to early metastasis, and poor prognosis. The association of MMP-1 with the invasion of tumor cells involves the G protein-coupled receptor, protease-activated receptor-1 (PAR1). *Agarwal et al*, found that MMP-1 activates PAR1, which is an important signal transducer in angiogenesis in peritoneal mouse model of ovarian cancer. The activation of MMP1-PAR1 induces the secretion of angiogenic factors of interleukin-8 from the ovarian carcinoma cells, which act on endothelial receptors, leading to endothelial cell proliferation, and migration. Therefore, MMP1-PAR1 pathways have been suggested as new targets for ovarian cancer therapy [27]. *Wang et al*, found increased expression of MMP-1 is closely correlated with the increased invasion of epithelial ovarian cancers. It was suggested that MMP1-PAR1 axis may be a future target for inhibition of metastasis in ovarian cancers. MMP-1 expression in ovarian cancer cell lines also requires other regulators as mixed lineage kinase 3 (MLK3) [28]. **MMP-2** is 72 kDa. MMP-2 degrades type IV collagen (the primary component of basement membrane and ECM). The invasion and metastasis of tumors depend on the degradation of ECM, expression of MMP-2 plays a positive role in the progression of ovarian cancer. Overexpression of MMP-2 in peritoneal implants of ovarian cancers is related to risk of death [29].

The expression of MMP-2 in serous and mucinous ovarian cancers is significantly higher compared with benign and borderline ovarian tumor [30]. *Huang* and *Sui* showed that the positive rate of MMP-2, vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and E-cadherin was higher in ovarian cancers than in benign and borderline ovarian tumors [31]. MMP-2 level is positively correlated with clinical stage and metastasis of ovarian cancers, but not with pathologic grading [32]. MMP-2 expression predicts a lower overall survival rate, and MMP-2 is considered a prognostic factor for ovarian cancer [33]. Several studies attempted to evaluate the role of MMP-2 as a therapeutic target for ovarian cancer. *Wang et al*, showed that epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation and migration of ovarian cancer cells by down-regulation of MMP-2 expression [34]. Zoledronic acid exerts robust inhibitory activity on ovarian cancer cells invasion through decreasing the intracellular level of MMP-2 [35]. **MMP-7** is the smallest member in MMPs family. MMP-7 overexpression was detected in cancer cells and it plays a critical role in both early and later stages of tumors [36]. *Wang et al*, showed that overexpression of MMP-7 in EOC is stimulated by VEGF and IL-8 [37]. Moreover, MMP-7 promotes the metastasis of ovarian cancer cells by activating gelatin enzyme. MMP-7 also promotes the metastasis of ovarian cancer through mesothelin (MSLN) pathways [38]. Therefore, blocking the MSLN-related pathway might be a therapeutic measure for the inhibition of ovarian cancer progression. *Zhao et al*, showed that triptolide inhibits the invasion of ovarian cancer cells through suppressing the expression of MMP-7 in vitro, and concluded that triptolide can be used as a candidate for treatment of ovarian cancer [39]. Increased metabolites of 5-lipoxygenase from hypoxic ovarian cancer cells can facilitate the invasion of macrophages, which is achieved via overexpression of MMP-7 through p38 pathway [40]. **MMP-9** has 92 kDa molecular mass and belongs to the type IV gelatin. MMP-9 capable of basement membrane type IV collagen degradation, which plays an essential role in the malignant tumor invasion and metastasis. *Wang et al*, demonstrated that platelet-derived growth factor-D promotes the ovarian cancer invasion and metastasis through up-regulating the expression of MMP-9 [41]. *Hu et al*, found that MMP-9 level in ovarian cancer is higher compared with normal ovarian tissues and benign ovarian tumors. Furthermore, the postoperative levels of MMP-9 in ovarian cancer are significantly reduced compared with preoperative levels [42]. Consequently, MMP-9 was suggested as a potential se-

rum marker for the diagnosis of ovarian cancer, and high serum MMP-9 level might be a predictor for refractory tumors. MMP-9 expression is positively correlated with FIGO staging, and lymph node metastasis in ovarian cancer, suggesting that increased MMP9 expression is associated with poor prognosis of ovarian cancer [43]. MMP-9 was suggested as a therapeutic target for ovarian cancer therapy. It has been shown that filamin B can suppress the ovarian cancer metastasis by down-regulation of MMP-9, and secretion of VEGF-A [44].

Bisdemethoxycurcumin can inhibit ovarian cancer growth through inhibition of MMP-2 and -9 expression [45]. **MMP-8** can promote the ovarian cancer metastasis via up-regulation of IL-1b [46]. MMP-14 (membrane-type 1 MMP (MT1-MMP)) plays an important role in cancers invasion and metastasis through activation of proMMP-2, and ECM degradation [47].

MMP-14 overexpression was associated with low progression rate, and better prognosis of ovarian cancers [48]. Moreover, patients with double expression of MMP-14 and CD44 have a poor prognosis [49]. *Kaimal et al*, showed that a monoclonal antibody, which selectively blocks MMP-14,

can restrain the growth, and angiogenesis of ovarian cancer [50]. Human leukocyte antigen G-G was associated with the tumor invasion and metastasis through mediating MMP-15 overexpression in ovarian cancers [51].

### Future Considerations

Cancer is a leading cause of death worldwide, and therefore the research on the new agents with potential anticancer properties are important. MMPs play crucial role in ECM remodeling, and cancer progression, so MMPs and MMPI could be a target for newly synthesized anticancer drugs.

The link of MMPs with the apoptosis, cell migration, and angiogenesis, allows the use of MMPs as tumor markers. An increased expression of MMPs in both tissues, and blood of patients with various cancers observed. MMPs have potential value as marker of invasiveness, and distant metastasis. There are few studies examining the concentration of MMPs in vivo, but the possibility of MMPs inhibition by synthetic inhibitors could offer the hope to implement new therapeutic strategies for treating cancer patients.

### References

- 1 Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177-183. doi: 10.3109/14756366.2016.1161620. [PubMed]
- 2 Fink K, Boratyński J. Rola metaloproteinaz w modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej w nowotworowym wzroście inwazyjnym, w przerzutowaniu i w angiogenezie [The role of metalloproteinases in modification of extracellular matrix in invasive tumor growth, metastasis and angiogenesis]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2012; 66:609-28. Polish. doi: 10.5604/17322693.1009705. [PubMed]
- 3 Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays*. 2007;29(10):1001-10. doi: 10.1002/bies.20636. [PubMed]
- 4 Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*. 2004;20(1):33-43. doi: 10.1016/j.tig.2003.11.004. [PubMed]
- 5 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):562-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002. [PubMed]
- 6 Bogaczewicz J, Sysa-Jedrzejowska A, Woźniacka A. Rola metaloproteinaz macierzy w pierwotnych układowych zapaleniach naczyń [Role of matrix metalloproteinases in primary systemic vasculitis]. *Pol Merkur Lekarski*. 2008;24(140):85-9. Polish. [PubMed]
- 7 Hrabec E, Naduk J, Streck M, et al. Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty--białka macierzy zewnątrzkomórkowej, hormony, cytokiny, chemokiny i ich receptory [Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors]. *Postepy Biochem*. 2007;53(1):37-45. Polish. [PubMed]
- 8 Yadav L, Puri N, Rastogi V, et al. Matrix metalloproteinases and cancer – roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(3):1085-91. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.3.1085. [PubMed]
- 9 Mannello F, Tonti G, Papa S. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005;5(4):285-98. doi: 10.2174/1568009054064615. [PubMed]
- 10 Noël A, Jost M, Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19(1):52-60. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.05.011. [PubMed]
- 11 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-74. doi: 10.1038/nrc745. [PubMed]
- 12 Rozanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, et al. The low-density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J Biol Chem*. 2004; 279(6):4260-8. doi: 10.1074/jbc.M311569200. [PubMed]
- 13 Krzyzanowska-Gołąb D, Lemańska-Perek A, Katnik-Prastowska I. et al. Fibronectin as an active component of the extracellular matrix]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007; 61:655-63. Polish. [PubMed]

- 14 Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, et al. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal*. 2011; 9:18. doi: 10.1186/1478-811X-9-18. [PubMed]
- 15 Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(3):161-8. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.05.002. [PubMed]
- 16 Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3481-3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026. [PubMed]
- 17 Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart et al., Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 9: 00-00, 2003. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):551-4. [PubMed]
- 18 Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):103-20. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.09.017. [PubMed]
- 19 López-Otín C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(7):509-19. doi: 10.1038/nrm858. [PubMed]
- 20 Yoon SO, Park SJ, Yun CH, et al. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(1):128-37. doi: 10.5483/bmbrep.2003.36.1.128. [PubMed]
- 21 Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, et al. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 18):3856-65. doi: 10.1242/jcs.03157. [PubMed]
- 22 Vihinen P, Ala-aho R, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005;5(3):203-20. doi: 10.2174/1568009053765799. [PubMed]
- 23 Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*. 2002;99(2):157-66. doi: 10.1002/ijc.10329. [PubMed]
- 24 Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(2):258-65. doi: 10.1016/j.jaad.2005.10.004. [PubMed]
- 25 Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6(3):307-12. doi: 10.1016/j.coph.2006.03.005. [PubMed]
- 26 Huang X, Chen S, Xu L, et al. Genistein inhibits p38 map kinase activation, matrix metalloproteinase type 2, and cell invasion in human prostate epithelial cells. *Cancer Res*. 2005;65(8):3470-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2807. [PubMed]
- 27 Agarwal A, Tressel SL, Kaimal R, et al. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res*. 2010;70(14):5880-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4341. [PubMed]
- 28 Wang FQ, Fisher J, Fishman DA. MMP-1-PAR1 axis mediates LPA-induced epithelial ovarian cancer (EOC) invasion. *Gynecol Oncol*. 2011;120(2):247-55. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.10.032. [PubMed]
- 29 Périgny M, Bairati I, Harvey I, et al. Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(2):226-31. doi: 10.1309/49LA9XCBG-WJ8F2KM. [PubMed]
- 30 Furuya M, Ishikura H, Kawarada Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases and related tissue inhibitors in the cyst fluids of ovarian mucinous neoplasms. *Gynecol Oncol*. 2000;78(2):106-12. doi: 10.1006/gyno.2000.5856. [PubMed]
- 31 Huang KJ, Sui LH. The relevance and role of vascular endothelial growth factor C, matrix metalloproteinase-2 and E-cadherin in epithelial ovarian cancer. *Med Oncol*. 2012;29(1):318-23. doi: 10.1007/s12032-010-9817-4. [PubMed]
- 32 Wang L, Jin X, Lin D, et al. Clinicopathologic significance of claudin-6, occludin, and matrix metalloproteinases -2 expression in ovarian carcinoma. *Diagn Pathol*. 2013; 8:190. doi: 10.1186/1746-1596-8-190. [PubMed]
- 33 Fu Z, Xu S, Xu Y, et al. The expression of tumor-derived and stromal-derived matrix metalloproteinase 2 predicted prognosis of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2015; 25(3):356-62. doi: 10.1097/IGC.0000000000000386. [PubMed]
- 34 Wang F, Chang Z, Fan Q, Wang L. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase-2. *Mol Med Rep*. 2014;9(3):1085-9. doi: 10.3892/mmr.2014.1909. [PubMed]
- 35 Gonzalez-Villasana V, Fuentes-Mattei E, Ivan C, et al. Rac1/Pak1/p38/MMP-2 Axis Regulates Angiogenesis in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(9):2127-37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2279. [PubMed]
- 36 Zohny SF, Fayed ST. Clinical utility of circulating matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), CC chemokine ligand 18 (CCL18) and CC chemokine ligand 11 (CCL11) as markers for diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Med Oncol*. 2010; 27(4):1246-53. doi: 10.1007/s12032-009-9366-x. [PubMed]
- 37 Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer*. 2005; 114 (1):19-31. doi: 10.1002/ijc.20697. [PubMed]
- 38 Chang MC, Chen CA, Chen PJ, et al. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *Biochem J*. 2012; 442(2):293-302. doi: 10.1042/BJ20110282. [PubMed]
- 39 Zhao H, Yang Z, Wang X, et al. Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin. *Exp Mol Med*. 2012;44(11):633-41. doi: 10.3858/emmm.2012.44.11.072. [PubMed]
- 40 Wen Z, Liu H, Li M, et al. Increased metabolites of 5-lipoxygenase from hypoxic ovarian cancer cells promote tumor-associated macrophage infiltration. *Oncogene*. 2015; 34(10):1241-52. doi: 10.1038/onc.2014.85. [PubMed]
- 41 Wang Y, Hu C, Dong R, et al. Platelet-derived growth factor-D promotes ovarian cancer invasion by regulating matrix metalloproteinases 2 and 9. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(12):3367-70. [PubMed]
- 42 Hu X, Li D, Zhang W, et al. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Arch Gynecol Obstet*. 2012; 286 (6):1537-43. doi: 10.1007/s00404-012-2456-6. [PubMed]
- 43 Li LN, Zhou X, Gu Y, et al. Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14 (7):4107-13. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.7.4107. [PubMed]

- 44 Bandaru S, Zhou AX, Rouhi P, et al. Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis*. 2014; 3(9): e119. doi: 10.1038/oncsis.2014.33. [PubMed]
- 45 Pei H, Yang Y, Cui L, et al. Bisdemethoxycurcumin inhibits ovarian cancer via reducing oxidative stress mediated MMPs expressions. *Sci Rep*. 2016; 6: 28773. doi: 10.1038/srep28773. [PubMed]
- 46 Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2003; 39 (17):2499-505. doi: 10.1016/j.ejca.2003.08.011. [PubMed]
- 47 Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2003; 22 (2-3):145-52. doi: 10.1023/a:1023039230052. [PubMed]
- 48 Trudel D, Desmeules P, Turcotte S, et al. Visual and automated assessment of matrix metalloproteinase-14 tissue expression for the evaluation of ovarian cancer prognosis. *Mod Pathol*. 2014;27(10):1394-404. doi: 10.1038/modpathol.2014.32. [PubMed]
- 49 Vos MC, Hollemans E, Ezendam N, et al. MMP-14 and CD44 in Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2016; 9(1):53. doi: 10.1186/s13048-016-0262-7. [PubMed]
- 50 Kaimal R, Aljumaily R, Tressel SL, et al. Selective blockade of matrix metalloprotease-14 with a monoclonal antibody abrogates invasion, angiogenesis, and tumor growth in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2013;73(8):2457-2467. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1426. [PubMed]
- 51 Lin A, Xu HH, Xu DP, et al. Multiple steps of HLA-G in ovarian carcinoma metastasis: alter NK cytotoxicity and induce matrix metalloproteinase-15 (MMP-15) expression. *Hum Immunol*. 2013;74(4):439-46. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.021. [PubMed]

1-бөлім  
**БОТАНИКА**

---

Section 1  
**BOTANY**

---

Раздел 1  
**БОТАНИКА**

**Y.A. Genievskaya<sup>1,2</sup>**, **S.S. Almerikova<sup>1</sup>**,  
**A.I. Abugalieva<sup>2</sup>**, **S.I. Abugalieva<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Industry, Kazakhstan, Almaty region

\*e-mail: [absaule@yahoo.com](mailto:absaule@yahoo.com)

## GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY OF GRAIN QUALITY TRAITS IN SPRING BARLEY COLLECTION GROWN IN KYZYLORDA REGION

Barley, among many other crops, has better resistance to harsh environmental conditions. Still, high temperature, drought, and soil salinity prevent the formation of high-quality grain, especially for the malting and brewing industry. In this study, spring barley accessions were tested in conditions of high-salinity soil of Kyzylorda region and analyzed for major grain quality traits, including protein,  $\beta$ -glucan, and starch contents, plumpness, grain hardness, and extractivity. Based on the results, the list of accessions optimal in the region for malting and the list for livestock feeding was made using the above-mentioned traits. Genome-wide association study revealed 20 marker-trait(s) associations combined into 7 quantitative trait loci (QTLs). Three QTLs demonstrated pleiotropic effect affecting grain protein,  $\beta$ -glucan, and starch content and extractivity, two QTLs were identified for grain protein and starch content and extractivity, one QTL was for grain hardness index, and one QTL for plumpness. Identified pleiotropic QTLs were genetically mapped in the vicinity of known barley flowering genes. QTLs identified in the study, as well as promising accessions, can be integrated into the barley breeding process in stressed conditions of Kyzylorda region.

**Key words:** *Hordeum vulgare* L., malting, livestock feed, genotype  $\times$  environment, molecular markers, single nucleotide polymorphism.

Ю.А. Гениевская<sup>1,2</sup>, Ш.С. Альмерикова<sup>1</sup>, А.И. Аbugалиева<sup>2</sup>, С.И. Аbugалиева<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты,  
Қазақстан, Алмалыбақ, Алматы облысы

\*e-mail: [absaule@yahoo.com](mailto:absaule@yahoo.com)

### Қызылорда облысы жағдайында өсірілген жаздық арпа коллекциясының дән сапасы белгілерінің ассоциацияларын толық геномдық талдау

Арпа – бұл басқа мәдени өсімдіктермен салыстырғанда қоршаған ортаның қолайсыз жағдайларына төзімділігі жоғары дақыл. Алайда, жоғары температура, құрғақшылық және тұзды топырақ жоғары сапалы дәннің қалыптасуына жол бермейді, әсіресе сыра қайнату өнеркәсібі үшін. Бұл зерттеуде жаздық арпа үлгілері Қызылорда облысының жоғары тұздануы жағдайында өсіріліп, дән сапасының негізгі ерекшеліктеріне, оның ішінде, ақуыз құрамына, крахмал,  $\beta$ -глюкан, сығындалғыштығы, дән натурасы және оның қаттылығы бойынша талданды. Алынған нәтижелер негізінде сыра қайнату өнеркәсібі үшін оңтайлы көрсеткіштерге ие үлгілер тізімі, сонымен қатар жем өндірісі үшін де тізбе құрылды. Толық геномдық талдау 7 сандық белгілер локусына (СБЛ) топтастырылған 20 маркер-белгі ассоциацияларын анықтады. Үш СБЛ дәннің құрамындағы ақуызға, крахмалға,  $\beta$ -глюканға және сығындыға плеотропты әсерін көрсетті, екі СБЛ ақуыз, крахмал мен сығынды үшін анықталды. Дәннің қаттылығы мен натурасы үшін, әрқайсысына 1 СБЛ анықталды. Табылған плейотропты СБЛ арпаның белгілі гүлдеу гендеріне жақын орналасты. Осы жұмыс барысында табылған барлық СБЛ, сондай-ақ перспективалы арпа үлгілері Қызылорда облысының стресстік жағдайында арпа селекциясы процесіне интеграциялануы мүмкін.

**Түйін сөздер:** *Hordeum vulgare* L., сыра қайнату, жем өндірісі, генотип  $\times$  орта, молекулалық маркерлер, бір нуклеотидтік полиморфизм.



Ю.А. Гениевская<sup>1,2</sup>, Ш.С. Альмерекова<sup>1</sup>, А.И. Аbugалиева<sup>2</sup>, С.И. Аbugалиева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства,  
Казахстан, Алматы, Алматинская область

\*e-mail: absaule@yahoo.com

### Полногеномный анализ ассоциаций признаков качества зерна коллекции ярового ячменя, выращенного в Кызылординской области

Ячмень – это культура, которая в сравнении с другими культурными растениями обладает лучшей устойчивостью к неблагоприятным условиям среды. Тем не менее, высокая температура, засуха и засоленная почва не позволяют формироваться высококачественному зерну, особенно для пивоваренной промышленности. В данной работе образцы ярового ячменя были выращены в условиях высокой засоленности Кызылординской области и проанализированы по основным признакам качества зерна, в т. ч. содержание белка, крахмала, β-глюкана, экстрактивности, натуре зерна и его твердости. На основе полученных результатов был сформирован список образцов с оптимальными показателями для пивоваренной промышленности, а также список для кормопроизводства. Полногеномный анализ выявил 20 ассоциаций маркер-признак сгруппированных в 7 локусов количественных признаков (ЛКП). Три ЛКП показали плеiotропный эффект в отношении содержания в зерне белка, крахмала, β-глюкана и экстрактивности, два ЛКП были обнаружены для содержания белка, крахмала и экстрактивности. Для твердозерности и натуре зерна было идентифицировано по 1 ЛКП. Найденные плеiotропные ЛКП находились в непосредственной близости к известным генам цветения ячменя. Все ЛКП, обнаруженные в ходе данной работы, а также перспективные образцы ячменя могут быть потенциально интегрированы в процесс селекции ячменя в стрессовых условиях Кызылординской области.

**Ключевые слова:** *Hordeum vulgare* L., пивоварение, кормопроизводство, генотип × среда, молекулярные маркеры, однонуклеотидный полиморфизм.

#### Abbreviations

GPC – grain protein content, GBGC – grain β-glucan content, GSC – grain starch content, GPL – grain plumpness, GH – grain hardness index, GEX – grain extractivity.

#### Introduction

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the widely produced cereal crops in the world (156.41 million metric tons in 2019 / 2020) [1]. In Kazakhstan, it is the third mostly-cultivated cereal after wheat and rice (18.25 % in 2020) [2]. Barley production in Kazakhstan has three basic directions: for the livestock feeding (43.3 % from total barley production), for the food industry (36.5 %), and for grain depositary or export (20.1 %) [2]. Barley plays an important role in Kazakhstan's economics. The country was the 7<sup>th</sup> largest barley exporter in 2019 / 2020 [1].

In Kazakhstan, barley is annually cultivated in all grain sowing regions. There is a list of highly productive cultivars developed for each particular region and approved by the State register of breeding achievements of the Republic of Kazakhstan [3]. Many regional breeding programs are focused on the development of highly productive cultivars with good grain quality. Although barley grain quality indicators may vary depending on the direction

of use, the content of protein, starch, and extractivity are very important. For example, barley grain used for malting require low protein content (less than 12 % according to the GOST 5060-86 [4]) and high extractivity, while grain for livestock feeding, on the contrary, have to be enriched with protein (more than 13 % according to the GOST 53900-2010 [5]). Most barley quality traits are complex quantitative traits with polygenic control [6]. In addition, there is a great influence of both genotype and environment on barley grain quality, as well as productivity. In this regard, the agricultural industry needs a large assortment of modern barley cultivars oriented on different usage directions for all grain-sowing regions of Kazakhstan.

Akmola and North Kazakhstan regions traditionally are leaders in spring barley production in Kazakhstan [2]. Together these two regions produced 46.6 % of the total barley yield in 2020 [2]. It is explained by high fertility of the soil and optimal climatic conditions in the northern Kazakhstan. At the same time, high ecological and genetic plasticity of barley allows developing cultivars adapted to drought and hot climate of the southern Kazakhstan too. One of the southern regions – Kyzylorda region – produced less than 1 % of the total spring barley in the country in 2020 [2]. The climate of Kyzylorda region is sharply continental; summers are hot and dry; winters are cold with unstable snow cover.

The average annual air temperature is 9.8 ° C. The soil in the region is meadow-boggy, typical for rice growing (the region is a leader in rice production in Kazakhstan), with less than 1 % humus content and chloride and sulfate salinity [7]. High soil salinity in combination with arid land results in poor protein synthesis and inhibited growth processes [8]. Thus, arid climate and barren soil have a great negative influence on both productivity and grain quality of barley in the region.

Previously, due to the collaborative projects between Institute of Plant Biology and Biotechnology and breeding organizations from the Ministry of Agriculture, barley accessions from Kazakhstan were studied for morphological traits and yield components in 7 different regions of Kazakhstan [9]. It was shown that some cultivars initially developed for the northern regions, for example, for the Kostanay region, in Kyzylorda region had a higher yield than the cultivars traditionally cultivated here [10]. Part of those local lines and cultivars were additionally studied in Kazakh Research Institute of Rice-growing (KRIRG) for morphological and productivity parameters in order to identify cultivars resistant to abiotic stresses [7], and for protein and starch content [8]. Promising lines from the world barley collection were also selected and recommended for the cultivation in Kazakhstan's Aral region, including Kyzylorda region [11]. Due to a collaborative study between IPBB and KRIRG (2009-2014) a new cultivar Shakhristan was developed and approved for cultivation in 2017 [3]. Nowadays, several barley cultivars with the yield of 2.5-3.5 t/ha, such as Rosava winter, Baishek, Saule, Zhuldyz, Asem, Arna, Shakhristan, and Syr Aruy, are officially approved for mass cultivation in Kyzylorda region [3, 12]. Still, it is possible to increase the yield and grain quality of spring barley in the harsh environment of Kyzylorda region by introducing new early ripening genotypes with good grain quality potential.

Modern crop breeding is an effective combination of traditional breeding and genomic technologies, such as marker-assisted selection (MAS) and genetic modifications (GMO) [13]. One of these technologies, called genome-wide association study (GWAS), has been successfully applied to identify the causative loci used in the breeding of crops for adaptation, productivity, and quality improvement by molecular breeding gene modifications [14-16]. This method is based on the searching of associations between genotypic and phenotypic variability resulting in the identification of molecular markers for the trait(s) [17]. Previously, in Kazakhstan, this approach was effectively used for a wide range of

crop studies: productivity of barley [19-20], wheat [20], and soybean [21], as well as diseases resistance in wheat [22], barley [23], and soybean [24]. Barley collection used in this study was already involved in GWAS analysis for productivity and adaptation [19-20]. However, this study is the first attempt to identify loci in barley genome associated with barley grain quality traits.

## Materials and methods

**Barley collection used for the study.** The barley collection used in this study was composed of two-rowed and six-rowed spring barley cultivars and breeding lines from the USA and Kazakhstan. USA's part of the collection included 557 accessions. Kazakhstan's part included 103 accessions originated from 6 agricultural institutions: 17 accessions from Aktobe Agricultural Experimental Station (AES) (Aktobe region), 15 accessions from Karabalyk AES (Kostanay region), 20 accessions from Karaganda AES (Karaganda region), 16 accessions from Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Industry (Almaty region), 20 accessions from Kazakh Research Institute of Rice-growing (Kyzylorda region), and 15 accessions from Krasnovodopad AES (Turkestan region) [9]. In total, 660 accessions were used for genotyping and phenotyping.

**Phenotyping and genotyping of barley collection.** Cultivation of 660 barley accessions was performed in the field of Kazakh Research Institute of Rice-growing (Kyzylorda region) [9]. Each line was grown in tripled one meter plots at each site. Grains of each accession were analyzed on the content of raw protein (GPC, %),  $\beta$ -glucan (GBGC, %), and starch (GSC, %), plumpness (GPL, g/L), grain hardness (GH, SKCS units), and extractivity (GEX, %) in the laboratory of grain quality (Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Industry). The GPC was determined by near-infrared spectroscopy using calibration equations based on Kjeldahl method [25] using FOSS 1241 and FOSS 2500. The GBGC was determined by the spectrofluorimetric method [26]. The GSC was analyzed using polarimetric method [27]. Also the collection was tested for indicators of plumpness, grain hardness index, and extractivity. GPL levels were determined using methods described in GOST 1084064 [28]; the hardness index (HI) measured by Single Kernel Characterization System 4100 (SKCS 4100; Perten Instruments, Huddinge, Sweden) according to the manufacturer's manual: GEX was calculated using method described in GOST 12136-77 [29]. The

correlations between quality traits and productivity components, such as thousand kernels weight (TKW, g) and yield per m<sup>2</sup> (YM2, g/m<sup>2</sup>) were also analyzed.

Accessions from Kazakhstan were genotyped using the 9K SNP chip by GoldenGate Illumina at the TraitGenetics company (TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Germany). The SNP genotyping data of BOPA1 and BOPA2 (Barley Oligo Pool Assay) sets from Illumina assays [30] for USA's accessions were obtained from Triticeae toolbox ([www.triticeaetoolbox.org](http://www.triticeaetoolbox.org)). In total, 2344 polymorphic SNPs with MAF (minor allele frequency) > 0.05 and with SNP's call rate > 0.90 were selected for GWAS analysis.

**GWAS analysis and statistics.** The genetic structure of 660 studied barley accessions was determined in order to obtain Q-matrix for GWAS analysis. Based on the  $\Delta K$  method [31], the K was set at 3. The Kinship matrix (K-matrix) was obtained using TASSEL 5 software [32]. The Mixed Linear Model (MLM) with K- and Q-matrices was

used for GWAS analysis. The significant associations were selected after the application of a threshold at  $P < 1E-3$ .

Pearson correlation and PCA analysis were performed using R statistical platform [33]. A genetic map with significant SNPs was constructed based on physical positions in barley genome [34] using MapChart 2.32 software [35].

## Results and Discussion

**Grain quality and productivity of barley grown in Kyzylorda.** Analysis of basic barley grain quality traits had showed a wide range of GH and GPL, while GPC, GSC, and GBGC had demonstrated a moderate level of variability (Table 1). Barley productivity measured as yield per m<sup>2</sup> varied greatly from 63.0 g/m<sup>2</sup> (USA's line FEG148-16) and up to 1336.0 g/m<sup>2</sup> (USA's line FEG142-16). Among Kazakhstan's accessions, the best yield was observed for the cultivar Nurinskiy 1 (655.0 g/m<sup>2</sup>) originated from Karaganda AES.

**Table 1** – Grain quality traits of USA's and Kazakhstan's barley grown in Kyzylorda 2010

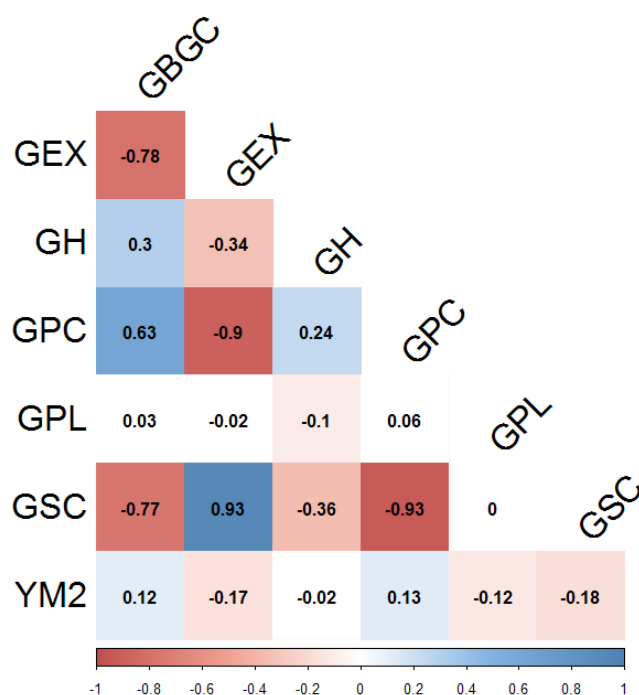
| Quality trait                        | Minimum | Maximum | Mean $\pm$ SD     |
|--------------------------------------|---------|---------|-------------------|
| Grain protein content (GPC)          | 10.2    | 15.5    | 12.6 $\pm$ 0.9    |
| Grain starch content (GSC)           | 50.6    | 57.0    | 54.0 $\pm$ 1.1    |
| Grain $\beta$ -Glucan content (GBGC) | 2.9     | 4.9     | 4.1 $\pm$ 0.2     |
| Grain hardness (GH)                  | 67.0    | 132.0   | 92.8 $\pm$ 8.6    |
| Grain plumpness (GPL)                | 300.0   | 704.0   | 585.4 $\pm$ 38.8  |
| Grain extractivity (GEX)             | 70.2    | 76.2    | 73.4 $\pm$ 1.0    |
| Yield per m <sup>2</sup> (YM2)       | 63.0    | 1336.0  | 599.5 $\pm$ 234.7 |
| Notes: SD – standard deviation.      |         |         |                   |

The correlational analysis had demonstrated strong positive relations between GEX and GSC. The concentration of  $\beta$ -Glucan was moderately positively associated with GPC and weakly associated with GH. GH was also positively associated with GPC. GSC and GEX were negatively correlated with GBGC, GH, and GPC. As for the GPL, a weak negative correlation was observed for GH only. Barley productivity (YM2) had positive associations with GBGC and GPC and negative correlations with GEX, GSC, and GPL.

**Promising barley accessions for Kyzylorda region.** The lists of promising lines and cultivars for

livestock feeding (Table 2) and for malting (Table 3) were made using the indicators of grain quality and productivity in Kyzylorda region 2010.

The list of accessions that had demonstrated promising levels of grain quality and yield for livestock feeding included 6 cultivars and breeding lines from Kazakhstan and 6 breeding lines from the USA (Table 2). All selected accessions had showed a high GPC level and good productivity; however, GPL close to the GOST was observed for USA's accessions only. Accessions from Kazakhstan exceeded GOST's requirement for GPL by 10% on average.



**Figure 1** – Pearson correlation among grain quality traits and productivity.

Red color denotes negative correlation, blue color – positive.

Color intensity increases with the increasing of significance ( $P < 0.05$ ).

**Table 2** – Promising accessions for livestock feeding according to grain quality traits and productivity of barley in Kyzylorda region

| #  | Barley accessions  | GPC (%)        | GPL (g/L)  | YM2 (g/m <sup>2</sup> ) |
|----|--|----------------|------------|-------------------------|
|    | <b>Livestock feeding (GOST R 53900-2010, first class)</b>    | <b>&gt; 13</b> | <b>590</b> | <b>-</b>                |
| 1  | Accession-1 (USA)  | 15.1           | 592        | 546                     |
| 2  | Accession-2 (USA)  | 15.0           | 598        | 314                     |
| 3  | Accession-3 (KAZ, Kazakh Research Institute of Rice-growing) | 15.4           | 661        | 566                     |
| 4  | Accession-4 (USA)  | 14.5           | 597        | 770                     |
| 5  | Accession-5 (KAZ, Kazakh Research Institute of Rice-growing) | 14.5           | 669        | 555                     |
| 6  | Accession-6 (KAZ, Krasnovodopad AES)                         | 14.5           | 665        | 449                     |
| 7  | Accession-7 (USA)  | 14.5           | 592        | 392                     |
| 8  | Accession-8 (USA)  | 15.5           | 512        | 528                     |
| 9  | Accession-9 (USA)  | 15.5           | 590        | 369                     |
| 10 | Accession-10 (KAZ, Aktobe AES)                               | 14.6           | 658        | 396                     |
| 11 | Accession-11 (KAZ, Krasnovodopad AES)                        | 14.8           | 627        | 418                     |
| 12 | Accession-12 (KAZ, Krasnovodopad AES)                        | 14.8           | 655        | 347                     |

The list of barley accessions that are promising for malting according to their grain quality and yield performance included 13 breeding lines from the USA only (Table 3). All of them had protein concentration less than 12% as required by GOST, but their average GEX was 3.3 % lower than the recommended level.

Results of Kazakhstan's and USA's barley phenotyping in Kyzylorda region had demonstrated a wide range for studied grain quality traits. One of the crucial barley quality traits for both malting and livestock feeding is protein. Generally, barley lines from the USA used in this study expectedly show lower GPC (Table 3), since the majority of them are

malting-oriented. As for Kazakhstan's accessions, promising lines were observed only for livestock feeding with relatively high GPC (Table 2). It is explained by the specialization of these accessions for the livestock. At the same time, the combination of accessions from Kazakhstan and the USA provided a good range for the GWAS.

For malting and brewing, low GPC has to be combined with low GBGC [36] and high level of GSC providing high GEX. Accessions grown in Kyzylorda region had demonstrated a strong positive correlation between GPC and GBGC, as well as the strong negative correlation between GPC and GSC / GEX (Figure 1). GH is another important trait for malting quality. Usually, GH declines with the increasing GSC and decreasing GPC [37]. Usually, the good grain quality of barley is associated with low productivity and low grain yield [38]. The same correlation was observed in the current study,

where high YM2 was associated with increased GPC, while high levels of GSC / GEX were negative correlated with the yield (Figure 1). Still, barley cultivars with high GPC and YM2 are a great raw material for livestock feeding [39]. GPL levels had showed absence of correlation with other quality traits except for weak negative correlation with GH (Figure 1), which confirms the small impact of GPL on other grain and malting qualities [40]. Generally, 6 grain quality traits of barley grown in Kyzylorda region had demonstrated good variability for GWAS analysis. In the studied collection, the majority of accessions from the USA had good grain quality levels for malting and brewing, while accessions from Kazakhstan fitted requirements for livestock feeding. The list of USA's accessions from table 3 is good candidates for the introduction into potential malting barley breeding in Kyzylorda region.

**Table 3** – Promising accessions for malting according to grain quality traits and productivity of barley in Kyzylorda region

| #  | Barley accessions                        | GPC (%)        | GEX (%)        | YM2 (g/m <sup>2</sup> ) |
|----|--|----------------|----------------|-------------------------|
|    | <b>Barley for malting (GOST 5060-86)</b> | <b>&lt; 12</b> | <b>&gt; 78</b> | <b>-</b>                |
| 1  | Accession-13 (USA)                       | 10.9           | 75.8           | 493                     |
| 2  | Accession-14 (USA)                       | 10.9           | 73.8           | 439                     |
| 3  | Accession-15 (USA)                       | 10.8           | 75.6           | 669                     |
| 4  | Accession-16 (USA)                       | 10.8           | 75.4           | 420                     |
| 5  | Accession-17 (USA)                       | 10.7           | 75.9           | 383                     |
| 6  | Accession-18 (USA)                       | 10.7           | 75.1           | 490                     |
| 7  | Accession-19 (USA)                       | 10.7           | 75.5           | 758                     |
| 8  | Accession-20 (USA)                       | 10.6           | 75.5           | 840                     |
| 9  | Accession-21 (USA)                       | 10.2           | 76.2           | 421                     |
| 10 | Accession-22 (USA)                       | 11.0           | 75.7           | 342                     |
| 11 | Accession-23 (USA)                       | 11.0           | 75.5           | 408                     |
| 12 | Accession-24 (USA)                       | 11.0           | 75.0           | 515                     |
| 13 | Accession-25 (USA)                       | 11.0           | 75.4           | 482                     |

**Marker-trait associations (MTAs) identified for barley grain quality traits.** In total, 20 MTAs for studied grain quality traits were identified on 6 out of 7 barley chromosomes (Table 4). Their positions on the barley physical map are demonstrated in Figure 2.

Seven SNPs associated with the different number of traits were positioned on all barley chromosomes, except chromosome 4H. Chromosome 6H contained 2 trait-associated SNPs. Several markers had demonstrated multiple associations. Markers

11\_20971 (1H), 11\_21505 (3H), and 12\_31509 (6H) were associated with 4 quality traits: GPC, GSC, GBGC, and GEX. Markers 11\_21414 (2H) and 11\_21103 (7H) were associated with 3 traits: GPC, GSC, and GEX. Marker 12\_10408 on chromosome 5H was associated with GPL only, and marker 12\_10199 on chromosome 6H only with GH. All 20 MTAs had demonstrated significant associations at  $P < 0.001$  (Table 4). The total phenotypic variation explained by MTA ( $R^2$ ) varied from 1.9 to 3.4% (Table 4).

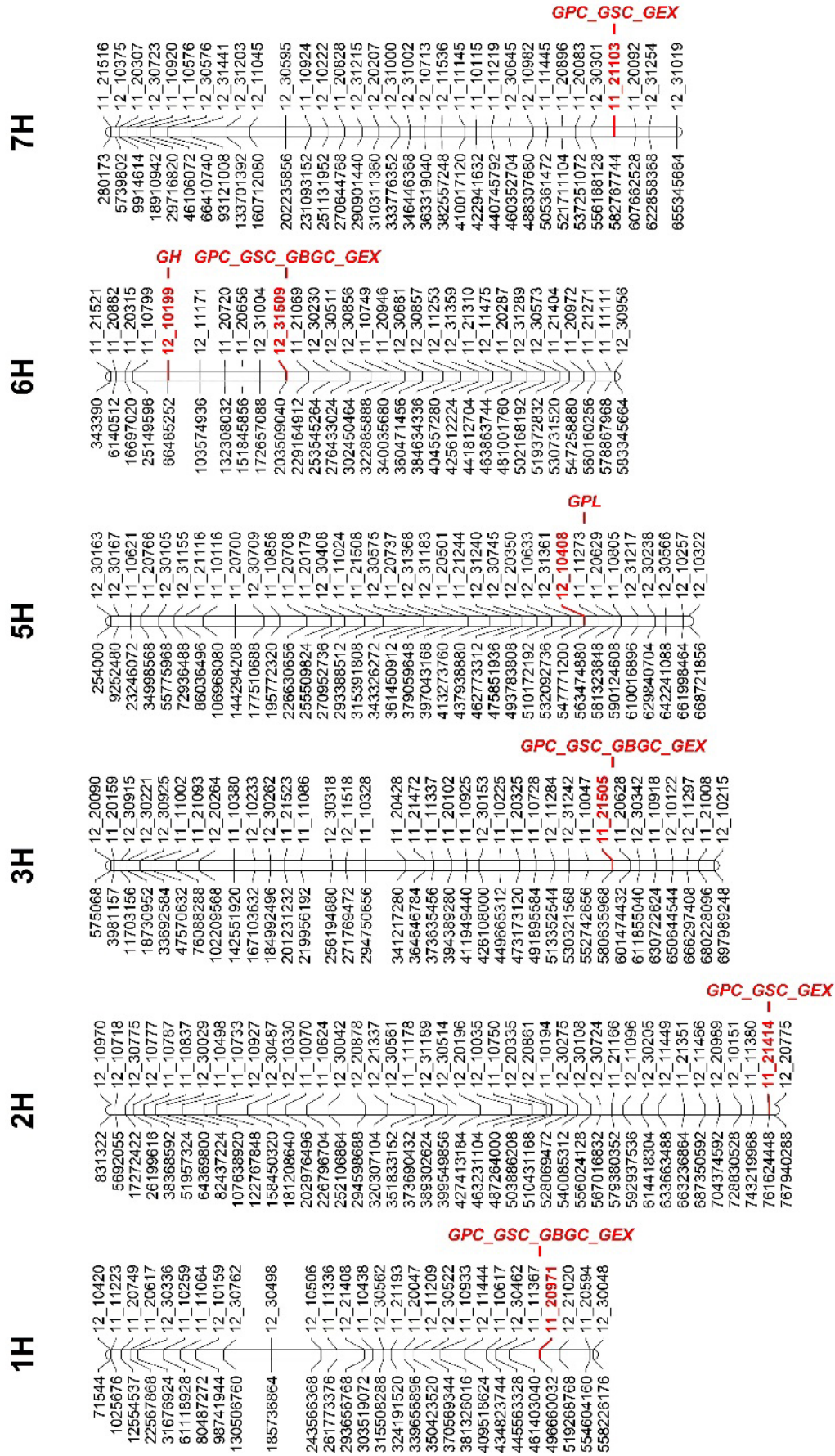
**Table 4** – Marker-trait associations for barley grain quality traits identified in Kyzylorda in 2010

| #  | Trait | SNP      | Chr. <sup>1</sup>    | Pos. (cM) <sup>1</sup> | Pos. (bp) <sup>2</sup> | P-value  | R2 (%) | All. | Effect  |
|----|-------|----------|----------------------|------------------------|------------------------|----------|--------|------|---------|
| 1  | GEX   | 11_20971 | U (1H <sup>2</sup> ) | U                      | 496,660,040            | 1.04E-04 | 2.9    | A    | -1.035  |
| 2  | GEX   | 11_21414 | 2H                   | 158.15                 | 761,624,420            | 4.73E-04 | 2.3    | A    | -0.733  |
| 3  | GEX   | 11_21505 | 3H                   | 87.24                  | 580,635,994            | 2.17E-04 | 2.3    | A    | -0.869  |
| 4  | GEX   | 12_31509 | 6H                   | 55                     | 203,509,034            | 1.29E-05 | 3.2    | A    | 1.021   |
| 5  | GEX   | 11_21103 | U (7H <sup>2</sup> ) | U                      | 582,767,743            | 7.59E-04 | 1.9    | A    | -0.718  |
| 6  | GBGC  | 11_20971 | U (1H <sup>2</sup> ) | U                      | 496,660,040            | 4.17E-04 | 3.0    | A    | 0.202   |
| 7  | GBGC  | 11_21505 | 3H                   | 87.24                  | 580,635,994            | 5.48E-04 | 2.3    | A    | 0.168   |
| 8  | GBGC  | 12_31509 | 6H                   | 55                     | 203,509,034            | 1.44E-04 | 2.8    | A    | -0.184  |
| 9  | GH    | 12_10199 | 6H                   | 45.44                  | 66,485,252             | 1.28E-04 | 2.5    | A    | 8.655   |
| 10 | GPC   | 11_20971 | U (1H <sup>2</sup> ) | U                      | 496,660,040            | 1.29E-04 | 2.8    | A    | 0.932   |
| 11 | GPC   | 11_21414 | 2H                   | 158.15                 | 761,624,420            | 2.62E-04 | 2.4    | A    | 0.685   |
| 12 | GPC   | 11_21505 | 3H                   | 87.24                  | 580,635,994            | 3.94E-04 | 2.1    | A    | 0.764   |
| 13 | GPC   | 12_31509 | 6H                   | 55                     | 203,509,034            | 2.10E-05 | 3.1    | A    | -0.915  |
| 14 | GPC   | 11_21103 | U (7H <sup>2</sup> ) | U                      | 582,767,743            | 4.78E-04 | 2.1    | A    | 0.677   |
| 15 | GSC   | 11_20971 | U (1H <sup>2</sup> ) | U                      | 496,660,040            | 4.20E-05 | 3.2    | A    | -1.208  |
| 16 | GSC   | 11_21414 | 2H                   | 158.15                 | 761,624,420            | 3.24E-04 | 2.4    | A    | -0.822  |
| 17 | GSC   | 11_21505 | 3H                   | 87.24                  | 580,635,994            | 1.21E-04 | 2.5    | A    | -1.002  |
| 18 | GSC   | 12_31509 | 6H                   | 55                     | 203,509,034            | 7.34E-06 | 3.4    | A    | 1.165   |
| 19 | GSC   | 11_21103 | U (7H <sup>2</sup> ) | U                      | 582,767,743            | 3.32E-04 | 2.2    | A    | -0.843  |
| 20 | GPL   | 12_10408 | 5H                   | 102.06                 | 547,771,176            | 4.74E-05 | 3.0    | A    | -51.508 |

Notes: <sup>1</sup> – Position according to 9K GoldenGate Illumina; <sup>2</sup> – Physical position according to Morex 2016 map. Chr. – chromosome; Pos. – position; R2 – phenotypic variation explained by MTA; All. – effective allele.

Twenty MTAs identified in this study were combined into 7 QTLs (Figure 2). Five out of those 7 QTLs had demonstrated pleiotropic effect since they were associated with several traits. It may indicate the presence of strong pleiotropic genes in these loci or in close regions. Grain quality traits are highly influenced by major heading and flowering genes. For example, SNP 11\_20971 (GPS, GSC, GBGC, GEX) on the chromosome 1H was previously identified as associated with adaptability traits (time of heading and grain maturity, plant height) and with thousand kernels weight [18], which is also quality trait. Heading time genes *HvCMF6a* [41], *HvCMF6b* [41] and *Esp1L / HvELF3 / eam8* [42] are located in the region close to SNP 11\_20971 and may be linked. The SNP 11\_21414 (GPS, GSC, GEX) on the chromosome 2H was also previously mentioned as associated with the time of heading and grain maturity, plant height, and peduncle length [18]. Heading time gene *HvAP2* located on 126.7 cM [43] may be linked with this SNP; however, the distance between them is relatively large (about 31 cM) [44]. The SNP 11\_21505 (GPS, GSC, GBGC, GEX) on

the chromosome 3H was also earlier described as highly pleiotropic associated with both yield and adaptability traits [18]. This SNP is probably linked with the heading time gene *HvCMF1* [41]. The next pleiotropic SNP is 12\_31509 (GPS, GSC, GBGC, GEX) on the chromosome 6H reported as associated with yield and adaptability traits [18] is more likely linked with the group of heading and flowering genes densely located in this region of the chromosome [44]. The last pleiotropic SNP 11\_21103 (GPS, GSC, GEX) on the chromosome 7H previously associated with yield and adaptability traits [18] may be connected with flowering gene *HvCO6* [44] located in this chromosome region. Thus, SNPs with the pleiotropic effects described above and associated with highly correlated grain quality traits GPS, GSC, GBGC, and GEX are most likely linked with known heading / flowering genes of barley. The mixed effect (negative and positive) on different traits may be used for more effective breeding of barley for either livestock feeding or malting. For example, SNP 12\_31509 may help to increase GSC and GEX, but decrease GPC and GBGC, which is good for malting barley.



**Figure 2** – Relative positions of identified marker-traits associations for barley grain quality traits. Positions in base pairs (bp) are indicated on the left side from the chromosome; SNP names are on the right side. SNP associated with traits are highlighted in color.



The last two QTLs were single-trait associated (Table 4). The only SNP for GPL was 12\_10408 on chromosome 5H (Figure 2). The flowering gene *HvPRR95* is located in 5cM apart from this SNP [41, 44], and they may be linked. The SNP 12\_10199 on chromosome 6H was the only one identified for GH in this study (Table 4). There is no information about barley quality-related genes or QTLs located in this region in the literature.

Results obtained in this study give a basis for the development of new barley cultivars, as well as for the integration of germplasm with good grain quality from the USA. A number of promising USA accessions may be used in crosses with local standard cultivars. MTAs for the studied grain quality traits can be used in MAS for the identification of promising genotypes.

### Conclusion

Grain quality traits studied in this work had demonstrated a wide ranges of variability. Acces-

sions from the USA showed good level of quality for malting, while accessions from Kazakhstan had quality levels better for livestock feeding. Two lists of promising barley accessions for malting (13 accessions) and for livestock feed (12 accessions) in Kyzylorda region were formed. In the course of GWAS analysis, 20 MTAs combined into 7 QTLs for grain quality traits were identified. Three QTLs demonstrated pleiotropic effect affecting grain protein,  $\beta$ -glucan and starch content and extractivity, two QTLs were identified for grain protein and starch content and extractivity, one QTL was for grain hardness and one QTL for plumpness.

### Funding

This study was supported by the grant AP08052804 “Development and validation of KASP arrays efficiency for key productivity and grain quality traits in two-rowed spring barley” from the Ministry of Education and Science of Republic of Kazakhstan.

### Литература

- 1 Online statistical platform Statista. URL: <https://www.statista.com/statistics/272760/barley-harvest-forecast/> (accessed: 01.03.2021).
- 2 Agency for Strategic planning and reforms of the Republic of Kazakhstan Bureau of National statistics. URL: <https://stat.gov.kz/> (accessed: 25.02.2021).
- 3 Государственный реестр селекционных достижений, рекомендуемых к использованию в Республике Казахстан. URL: [http://adilet.zan.kz/rus/docs/V090005759\\_](http://adilet.zan.kz/rus/docs/V090005759_) (accessed: 27.02.2021).
- 4 ГОСТ 5060-86. Ячмень пивоваренный. Технические условия. URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-5060-86> (accessed: 28.02.2021).
- 5 ГОСТ Р 53900-2010. Ячмень кормовой. Технические условия. URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-r-53900-2010> (accessed: 28.02.2021).
- 6 Matthies I.E., Malosetti M., Röder M.S., van Eeuwijk F. Genome-Wide Association Mapping for Kernel and Malting Quality Traits Using Historical European Barley Records // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(11). – P. e110046.
- 7 Tokhetova L.A., Abzhalelov B.B., Kuzhamberdieva S.Z., Bekova M.K., Demesinova A.A. Results of ecological test of sorts of a spring barley are in rice crop rotation of Kyzylorda area // *International Journal of Experimental Education*. – 2016. – Vol. 5-1. – P. 91-96.
- 8 Zhu J., Fan Y., Shabala S., Li C., Lv C., Guo B., Xu R., Zhou M. Understanding Mechanisms of Salinity Tolerance in Barley by Proteomic and Biochemical Analysis of Near-Isogenic Lines // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21(4). – P. 1516.
- 9 Turuspekov Y., Sariyev B., Chudinov V., Sereda G., Tokhetova L., Ortaev A., et al. Genotype×environment interaction patterns for grain yield of spring barley in different regions of Kazakhstan // *Russian Journal of Genetics*. – 2013. – Vol.49(2). – P. 196-205.
- 10 Тохетова Л. А. Шермагамбетов К., Таутенов И. А., Байжанова Б. К., Демесинова А. А., Бекова М. К., ТОО «Казахский НИИ рисоводства им. И. Жахаева», Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата. Исходный материал для селекции ячменя кормового направления: источники и доноры высокого содержания белка // *Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты*. – 2016. – №3(71). – С. 225-231.
- 11 Тохетова Л. А. Бекова М. К., Байтанатова А. К., Демесинова А. А. Изучение мировой коллекции ярового ячменя в условиях казахстанского Приаралья // *Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве*. – 2018. – С. 54-58.
- 12 Карлиханов Т. К., Шаянбекова Б. Р., Балмаханов А. А., Танирбергенов Д. М. Технология выращивания культуры ячменя в условиях казахстанского Приаралья // *Наука и Мир*. – 2015. – Т. 2. – №. 3. – С. 126-127.
- 13 Pérez-de-Castro A.M., Vilanova S., Cañizares J., Pascual L., Blanca J.M., Díez M.J., Prohens J., Picó B. Application of genomic tools in plant breeding // *Curr Genomics*. – 2012. – Vol. 13(3). – P. 179-195.
- 14 Basile S. M. L., Ramírez I. A., Crescente J. M., Conde M. B., Demichelis M., Abbate P., Rogers W. J., Pontaroli A. C., Helguera M., Vanzetti L. S. Haplotype block analysis of an Argentinean hexaploid wheat collection and GWAS for yield components and adaptation // *BMC plant biology*. – 2019. – Vol. 19(1). – P. 1-16.



- 15 Pantalião G. F., Narciso M., Guimarães C., Castro A., Colombari J. M., Breseghello F., Rodrigues L., Vianello R. P., Borba T. O., Brondani C. Genome wide association study (GWAS) for grain yield in rice cultivated under water deficit // *Genetica*. – 2016. – Vol. 144(6). – P. 651-664.
- 16 Yang Y., Chai Y., Zhang X., Lu S., Zhao Z., Wei D., Chen L., Hu Y. G. Multi-locus GWAS of quality traits in bread wheat: mining more candidate genes and possible regulatory network // *Frontiers in plant science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1091.
- 17 Zargar S. M., Raatz B., Sonah H., Bhat J. A., Dar Z. A., Agrawal G. K., Rakwal R. Recent advances in molecular marker techniques: insight into QTL mapping, GWAS and genomic selection in plants // *Journal of crop science and biotechnology*. – 2015. – Vol. 18(5). – P. 293-308.
- 18 Genievskaia Y., Almerikova S., Sariev B., Chudinov V., Tokhetova L., Sereda G., Ortaev A., Tsygankov V., Blake T., Chao S., Sato K., Abugalieva S., Turuspekov Y. Marker-trait associations in two-rowed spring barley accessions from Kazakhstan and the USA // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13 (10). – P. e0205421
- 19 Almerikova S., Sariev B., Abugalieva A., Chudinov V., Sereda G., Tokhetova L., Ortaev A., Tsygankov V., Blake T., Chao S., Genievskaia Y., Abugalieva S., Turuspekov Y. Association mapping for agronomic traits in six-rowed spring barley from the USA harvested in Kazakhstan // *PLOS ONE*. – 2019. – V. 14(8). – P. e0221064.
- 20 Turuspekov Y., Baibulatova A., Yermekbayev K., Tokhetova L., Chudinov V., Sereda G., Ganai M.W, Griffiths S., Abugalieva S. GWAS for plant growth stages and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) harvested in three regions of Kazakhstan // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17 (S1). P. 51-61.
- 21 Zatybekov A., Abugalieva S., Didorenko S., Gerasimova Y., Sidorik I., Anuarbek Sh., Turuspekov Y. GWAS of agronomic traits in soybean collection included in breeding pool in Kazakhstan // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol.17 (S1). – P. 64-70.
- 22 Genievskaia Y., Turuspekov Y., Rsaliev A., Abugalieva S. Genome-wide association mapping for resistance to leaf, stem, and yellow rusts of common wheat under field conditions of South Kazakhstan // *PeerJ*. – 2020. – Vol. 8. – P. e9820.
- 23 Turuspekov Y., Ormanbekova D., Rsaliev A., Abugalieva S. Genome-wide association study on stem rust resistance in Kazakh spring barley lines // *BMC Plant Biology*. – 2016. – Vol. 16. – P. 13-21.
- 24 Zatybekov A., Abugalieva S., Didorenko S., Rsaliev A., Turuspekov Y. GWAS of soybean breeding collection for resistance to fungal diseases in condition of South-East and South Kazakhstan // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding (Вавиловский журнал генетики и селекции)*. – 2018. – Vol. 22(5). – P. 536-543.
- 25 Sáez-Plaza P., Michałowski T., Navas M. J., Asuero A. G., Wybraniec S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 43(4). – P. 178-223.
- 26 Williams P., El Hamein F.J., Nakkoul H., Rihawi S. *Crop Quality Evaluation Methods and Guidelines*. – Aleppo:ICARDA, 1988. – 145 pp.
- 27 Савин В.Н., Аbugалиев И.А., Аbugалиева А.И. Аналитические исследования в растениеводстве // *Доклады РАСХН*. – 1998. – №2. – С.13-15.
- 28 ГОСТ 10840-64 Зерно. Методы определения натуры. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200023848> (accessed: 25.02.2021).
- 29 ГОСТ 12136-77 Зерно. Метод определения экстрактивности ячменя. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200024315> (accessed: 25.02.2020).
- 30 Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley // *BMC genomics*. – 2009. – Vol. 10(1). – P. 582.
- 31 Earl D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conservation genetics resources*. – 2012. – Vol. 4(2). – P. 359-361.
- 32 Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23. – P. 2633-2635.
- 33 R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
- 34 The Triticeae Toolbox (T3). Barley. URL: <https://triticeaetoolbox.org/barley/> (accessed 26.02.2021).
- 35 Voorrips R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs // *The Journal of Heredity*. – 2002. – Vol. 93 (1). – P. 77-78.
- 36 Wang J., Zhang G., Chen J., Wu F. The changes of  $\beta$ -glucan content and  $\beta$ -glucanase activity in barley before and after malting and their relationships to malt qualities // *Food Chemistry*. – 2004. – Vol. 86(2). – P. 223-228.
- 37 Psota V., Vějražka K., Faměra O., Hřečka M. Relationship between grain hardness and malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Journal of the Institute of Brewing*. – 2007. – Vol. 113(1). – P. 80-86.
- 38 Титова Е. М., Внукова М. А. Продуктивность и качество сортов пивоваренного ячменя // *Вестник ОрелГАУ*. – 2008. – №3.
- 39 Зюба С. Н. Условия выращивания и кормовая продуктивность ярового ячменя // *Земледелие*. – 2012. – №. 4.
- 40 Ториков В. Е., Мельникова О. В., Клименков Ф. И. Оценка пригодности сортов ярового ячменя на пивоваренные цели // *Вестник ФГОУ ВПО Брянская ГСХА*. – 2007. – №6.
- 41 Cockram J., Thiel T., Steuernagel B., Stein N., Taudien S., Bailey P.C., O'Sullivan D.M. Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the Poaceae // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – P. e45307.
- 42 Zakhrebekova S., Gough S.P., Braumann I., Müller A.H., Lundqvist J., Ahmann K., Dockter C., Matyszczyk I., Kurowska M., Druka A., Waugh R., Graner A., Stein N., Steuernagel B., Lundqvist U., Hansson M. Induced mutations in circadian clock regulator *Mat-a* facilitated short-season adaptation and range extension in cultivated barley // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109(11). – P. 4326-4331.
- 43 Nair S.K., Wang N., Turuspekov Y., Pourkheirandish M., Sinsuwongwat S., Chen G., Sameri M., Tagiri A., Honda I., Watanabe Y., Kanamori H., Wicker T., Stein N., Nagamura Y., Matsumoto T., Komatsuda T. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided HvAP2 mRNA cleavage // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – P. 490-495.

44 Alqudah A.M., Sharma R., Pasam R.K., Graner A., Kilian B., Schnurbusch T. Genetic dissection of photoperiod response based on GWAS of pre-anthesis phase duration in spring barley // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9(11). – P. e113120.

## References

- 1 Online statistical platform Statista. URL: <https://www.statista.com/statistics/272760/barley-harvest-forecast/> (accessed: 01.03.2021).
- 2 Agency for Strategic planning and reforms of the Republic of Kazakhstan Bureau of National statistics. URL: <https://stat.gov.kz/> (accessed: 25.02.2021).
- 3 Gosudarstvennyy reestr selekcionnyh dostizhenij, rekomenduemyh k ispol'zovaniyu v Respublike Kazahstan. URL: <http://adilet.zan.kz/rus/docs/V090005759> (accessed: 27.02.2021).
- 4 GOST 5060-86. YAchmen' pivovarennyj. Tekhnicheskie usloviya. URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-5060-86> (accessed: 28.02.2021).
- 5 GOST R 53900-2010. YAchmen' kormovoj. Tekhnicheskie usloviya. URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-r-53900-2010> (accessed: 28.02.2021).
- 6 Matthies I.E., Malosetti M., Röder M.S., van Eeuwijk F. Genome-Wide Association Mapping for Kernel and Malting Quality Traits Using Historical European Barley Records // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(11). – P. e110046.
- 7 Tokhetova L.A., Abzhalelov B.B., Kuzhamberdieva S.Z., Bekova M.K., Demesinova A.A. Results of ecological test of sorts of a spring barley are in rice crop rotation of Kyzylorda area // *International Journal of Experimental Education*. – 2016. – Vol. 5-1. – P. 91-96.
- 8 Zhu J., Fan Y., Shabala S., Li C., Lv C., Guo B., Xu R., Zhou M. Understanding Mechanisms of Salinity Tolerance in Barley by Proteomic and Biochemical Analysis of Near-Isogenic Lines // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21(4). – P. 1516.
- 9 Turuspekov Y., Sariev B., Chudinov V., Sereda G., Tokhetova L., Ortaev A., et al. Genotype×environment interaction patterns for grain yield of spring barley in different regions of Kazakhstan // *Russian Journal of Genetics*. – 2013. – Vol.49(2). – P. 196-205.
- 10 Tohetova L. A. SHermagambetov K., Tautenov I. A., Bajzhanova B. K., Demesinova A. A., Bekova M. K., TOO «Kazahskij NII risovodstva im. I. Zhahaeva», Kyzylordinskij gosudarstvennyj universitet im. Korkyt Ata. Iskhodnyj material dlya selekcii yachmenya kormovogo napravleniya: istochniki i donory vysokogo sodержaniya belka // *Izdenister, nətizheler – Issledovaniya, rezul'taty*. – 2016. – №3(71). – С. 225-231.
- 11 Tohetova L. A. Bekova M. K., Bajtanatova A. K., Demesinova A. A. Izuchenie mirovoj kollekcii yarovogo yachmenya v usloviyah kazahstanskogo Priaral'ya // *Metody i tekhnologii v selekcii rastenij i rastenievodstve*. – 2018. – S. 54-58.
- 12 Karlihanov T. K., SHayanbekova B. R., Balmahanov A. A., Tanirbergenov D. M. Tekhnologiya vyrashchivaniya kul'tury yachmenya v usloviyah kazahstanskogo Priaral'ya // *Nauka i Mir*. – 2015. – T. 2. – №. 3. – S. 126-127.
- 13 Pérez-de-Castro A.M., Vilanova S., Cañizares J., Pascual L., Blanca J.M., Díez M.J., Prohens J., Picó B. Application of genomic tools in plant breeding // *Curr Genomics*. – 2012. – Vol. 13(3). – P. 179-195.
- 14 Basile S. M. L., Ramírez I. A., Crescente J. M., Conde M. B., Demichelis M., Abbate P., Rogers W. J., Pontaroli A. C., Helguera M., Vanzetti L. S. Haplotype block analysis of an Argentinean hexaploid wheat collection and GWAS for yield components and adaptation // *BMC plant biology*. – 2019. – Vol. 19(1). – P. 1-16.
- 15 Pantaliao G. F., Narciso M., Guimarães C., Castro A., Colombari J. M., Breseghello F., Rodrigues L., Vianello R. P., Borba T. O., Brondani C. Genome wide association study (GWAS) for grain yield in rice cultivated under water deficit // *Genetica*. – 2016. – Vol. 144(6). – P. 651-664.
- 16 Yang Y., Chai Y., Zhang X., Lu S., Zhao Z., Wei D., Chen L., Hu Y. G. Multi-locus GWAS of quality traits in bread wheat: mining more candidate genes and possible regulatory network // *Frontiers in plant science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1091.
- 17 Zargar S. M., Raat B., Sonah H., Bhat J. A., Dar Z. A., Agrawal G. K., Rakwal R. Recent advances in molecular marker techniques: insight into QTL mapping, GWAS and genomic selection in plants // *Journal of crop science and biotechnology*. – 2015. – Vol. 18(5). – P. 293-308.
- 18 Genievskaia Y., Almerikova S., Sariev B., Chudinov V., Tokhetova L., Sereda G., Ortaev A., Tsygankov V., Blake T., Chao S., Sato K., Abugalieva S., Turuspekov Y. Marker-trait associations in two-rowed spring barley accessions from Kazakhstan and the USA // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13 (10). – P. e0205421
- 19 Almerikova S., Sariev B., Abugalieva A., Chudinov V., Sereda G., Tokhetova L., Ortaev A., Tsygankov V., Blake T., Chao S., Genievskaia Y., Abugalieva S., Turuspekov Y. Association mapping for agronomic traits in six-rowed spring barley from the USA harvested in Kazakhstan // *PLOS ONE*. – 2019. – V. 14(8). – P. e0221064.
- 20 Turuspekov Y., Baibulatova A., Yermekbayev K., Tokhetova L., Chudinov V., Sereda G., Ganal M.W., Griffiths S., Abugalieva S. GWAS for plant growth stages and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) harvested in three regions of Kazakhstan // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol. 17 (S1). R. 51-61.
- 21 Zatybekov A., Abugalieva S., Didorenko S., Gerasimova Y., Sidorik I., Anuarbek Sh., Turuspekov Y. GWAS of agronomic traits in soybean collection included in breeding pool in Kazakhstan // *BMC Plant Biology*. – 2017. – Vol.17 (S1). – R. 64-70.
- 22 Genievskaia Y., Turuspekov Y., Rsaliyev A., Abugalieva S. Genome-wide association mapping for resistance to leaf, stem, and yellow rusts of common wheat under field conditions of South Kazakhstan // *PeerJ*. – 2020. – Vol. 8. – P. e9820.
- 23 Turuspekov Y., Ormanbekova D., Rsaliyev A., Abugalieva S. Genome-wide association study on stem rust resistance in Kazakh spring barley lines // *BMC Plant Biology*. – 2016. – Vol. 16. – P. 13-21.
- 24 Zatybekov A., Abugalieva S., Didorenko S., Rsaliyev A., Turuspekov Y. GWAS of soybean breeding collection for resistance to fungal diseases in condition of South-East and South Kazakhstan // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding (Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii)*. – 2018. – Vol. 22(5). – P. 536-543.
- 25 Sáez-Plaza P., Michałowski T., Navas M. J., Asuero A. G., Wybraniec S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 43(4). – P. 178-223.

- 26 Williams P., El Hamein F.J., Nakkoul H., Rihawi S. Crop Quality Evaluation Methods and Guidelines. – Aleppo:ICARDA, 1988. – 145 pp.
- 27 Savin V.N., Abugaliev I.A., Abugalieva A.I. Analiticheskie issledovaniya v rastenievodstve // Doklady RASKHN. – 1998. – №2. – S.13-15.
- 28 GOST 10840-64 Zerno. Metody opredeleniya natury. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200023848> (accessed: 25.02.2021).
- 29 GOST 12136-77 Zerno. Metod opredeleniya ekstraktivnosti yachmenya. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200024315> (accessed: 25.02.2020).
- 30 Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley // BMC genomics. – 2009. – Vol. 10(1). – P. 582.
- 31 Earl D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation genetics resources. – 2012. – Vol. 4(2). – P. 359-361.
- 32 Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23. – P. 2633-2635.
- 33 R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. – 2013. URL <http://www.R-project.org/>.
- 34 The Triticeae Toolbox (T3). Barley. URL: <https://triticeaetoolbox.org/barley/> (accessed 26.02.2021).
- 35 Voorrips R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs // The Journal of Heredity. – 2002. – Vol. 93 (1). – P. 77-78.
- 36 Wang J., Zhang G., Chen J., Wu F. The changes of  $\beta$ -glucan content and  $\beta$ -glucanase activity in barley before and after malting and their relationships to malt qualities // Food Chemistry. – 2004. – Vol. 86(2). – P. 223-228.
- 37 Psota V., Vejražka K., Faměra O., Hřčka M. Relationship between grain hardness and malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Journal of the Institute of Brewing. – 2007. – Vol. 113(1). – P. 80-86.
- 38 Titova E. M., Vnukova M. A. Produktivnost' i kachestvo sortov pivovarennogo yachmenya // Vestnik OreIGAU. – 2008. – №3.
- 39 Zyuba S. N. Usloviya vyrashchivaniya i kormovaya produktivnost' yarovogo yachmenya // Zemledelie. – 2012. – №. 4.
- 40 Torikov V. E., Mel'nikova O. V., Klimenkov F. I. Ocenka prigodnosti sortov yarovogo yachmenya na pivovarennye celi // Vestnik FGOU VPO Bryanskaya GSKHA. – 2007. – №6.
- 41 Cockram J., Thiel T., Steuernagel B., Stein N., Taudien S., Bailey P.C., O'Sullivan D.M. Genome dynamics explain the evolution of flowering time CCT domain gene families in the Poaceae // PLoS one. – 2012. – Vol. 7. – P. e45307.
- 42 Zakhrebekova S., Gough S.P., Braumann I., Müller A.H., Lundqvist J., Ahmann K., Dockter C., Matyszcak I., Kurowska M., Druka A., Waugh R., Graner A., Stein N., Steuernagel B., Lundqvist U., Hansson M. Induced mutations in circadian clock regulator *Mat-a* facilitated short-season adaptation and range extension in cultivated barley // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Vol. 109(11). – P. 4326-4331.
- 43 Nair S.K., Wang N., Turuspekov Y., Pourkheirandish M., Sinsuwongwat S., Chen G., Sameri M., Tagiri A., Honda I., Watanabe Y., Kanamori H., Wicker T., Stein N., Nagamura Y., Matsumoto T., Komatsuda T. Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided HvAP2 mRNA cleavage // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 107. – P. 490-495.
- 44 Alqudah A.M., Sharma R., Pasam R.K., Graner A., Kilian B., Schnurbusch T. Genetic dissection of photoperiod response based on GWAS of pre-anthesis phase duration in spring barley // PLoS One. – 2014. – Vol. 9(11). – P. e113120.

IRSTI 68.35.31

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v87.i2.05>**A.M. Digarbaeva\*** , **A.N. Kaliyeva** , **Nurmanbek Aidyn** 

Kazakh National Women's Teacher Training University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: [asema\\_1985.kz@mail.ru](mailto:asema_1985.kz@mail.ru)

## STUDY OF THE HEAVY METALS EFFECT ON THE PIGMENT SYSTEM OF CORN VARIETIES

Heavy metals are metals that are toxic to organisms when released into the environment in large quantities. In recent years, this term refers only to the following elements: lead, zinc, cadmium, mercury, molybdenum, manganese, nickel, tin, cobalt, titanium, copper, vanadium.

The article deals with the current pollution of the environment, as well as the use of measures to combat plants that are resistant to this herd. In addition, the adaptation degree of plants to changes in environmental factors, new environmental conditions depends on the composition of chlorophylls and carotenoids, which are the main photoreceptors of photosynthetic cells. However, the exposure degree of plants to the pigment complex depends on the type of plant, growth conditions, the composition and concentration of toxicants and the duration of their action. An overview of the research presented in the general article shows that heavy metals have a significant negative impact on plant growth. The study of plants, especially those used for food purposes, is very important in the maximum prevention of these processes. In this regard, the purpose of the study was to determine the effect of heavy metals on the pigment system of corn varieties. We observed the effect of heavy metal ions on photosynthetic pigments, resistant and intolerant varieties of 14-day-old corn varieties (Turan-170, Turan-480, Kazakhstan-435, Tauelsizdik-20). During the experiment, we concluded that the varieties Turan-170, Turan-480, Tauelsizdik-20 are resistant to corn in terms of the content of carotenoids, chlorophyll-a, chlorophyll-b pigments in corn varieties, and Kazakhstan-435 is intolerant. This is because Kazakhstan-435 may have varietal characteristics.

In general, heavy metals have a negative effect on plants, reduce the content of chlorophyll and carotenoids, cause shifts in the structure of chloroplast membranes, which negatively affects the intensity of photosynthesis.

**Key words:** chlorophyll, carotenoids, pigment, heavy metal, photosynthesis, cadmium, corn, plants.

A.M. Дигарбаева\*, А.Н. Калиева, Нұрманбек Айдын

Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: [asema\\_1985.kz@mail.ru](mailto:asema_1985.kz@mail.ru)

### Жүгері сорттарының пигмент жүйесіне ауыр металдардың әсерін зерттеу

Ауыр металдар – қоршаған ортаға көп мөлшерде түскенде организмдерді уландыратын металдар. Бұл терминмен соңғы жылдары тек қана мынадай элементтер: қорғасын, мырыш, кадмий, сынап, молибден, марганец, никель, қалайы, кобальт, титан, мыс, ванадий аталады.

Мақалада қазіргі таңда қоршаған ортаның ластануы, сонымен қатар осы ортада төзімділік беретін өсімдіктермен ауылшаруашылық дақылдары арқылы күресу шараларын қолдану. Сонымен қатар өсімдіктер қоршаған орта факторларының өзгеруіне, жаңа экологиялық жағдайларға бейімделу дәрежесі фотосинтетикалық жасушаның негізгі фоторецепторлары болып табылатын хлорофиллдер мен каротиноидтардың құрамына байланысты. Алайда өсімдіктердің пигмент кешеніне әсер ету дәрежесі өсімдіктің түріне, өсу жағдайларына, токсиканттардың құрамы мен концентрациясына және олардың әсер ету ұзақтығына байланысты. Жалпы мақалада келтірілген зерттеу жұмыстарына шолу жасау барысында, ауыр металдардың өсімдіктердің өсіп-дамуына айтарлықтай кері әсері байқалады. Осы процестердің барынша алдын алуда, әсіресе азық-түліктік мақсатта пайдаланылатын өсімдіктерді зерттеу өте өзекті болып табылады. Осы орайда зерттеу жұмысының мақсаты – жүгері сорттарының пигмент жүйесіне ауыр металдардың әсерін анықтау. 14 күндік жүгері сорттарына (Тұран-170, Тұран-480, Қазақстан-435, Тәуелсіздік-20) ауыр метал иондарының фотосинтез пигменттеріне әсерін, төзімді және төзімсіз сорттарды байқадық. Тәжірибе жүргізу барысында жүгері сорттарында каротиноид, хлорофилл-а, хлорофилл-в пигменттерінің көрсеткіштерінің мөлшері бойынша Тұран-170, Тұран-480, Тәуелсіздік-20 сорттары төзімді, Қазақстан-435 сорты төзімсіз деп тұжырымдадық. Себебі Қазақстан-435 сорттық ерекшелігі де болуы мүмкін.

Жалпы ауыр металдар өсімдіктерге кері әсер етеді, хлорофилл мен каротиноидтардың құрамын төмендетеді, хлоропласттар мембраналарының құрылымында ығысулар тудырады, бұл фотосинтездің қарқындылығына теріс әсер етеді.

**Түйін сөздер:** хлорофилл, каротиноид, пигмент, ауыр метал, фотосинтез, кадмий, жүгері, өсімдіктер.

А.М. Дигарбаева\*, А.Н. Калиева, Нурманбек Айдын

Казахский национальный женский педагогический университет, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: asema\_1985.kz@mail.ru

### **Изучение влияния тяжелых металлов на пигментную систему сортов кукурузы**

Тяжелые металлы – это металлы, которые токсичны для организмов при попадании в окружающую среду в больших количествах. В последнее время этим термином обозначаются только следующие элементы: свинец, цинк, кадмий, ртуть, молибден, марганец, никель, олово, кобальт, титан, медь, ванадий.

В статье рассматривается современное загрязнение окружающей среды, а также применение мер борьбы с растениями, устойчивыми к этой среде. Кроме того, степень адаптации растений к изменениям факторов окружающей среды, новым условиям среды зависит от состава хлорофиллов и каротиноидов, которые являются основными фоторецепторами фотосинтетических клеток. Однако степень воздействия на растения пигментного комплекса зависит от вида растения, условий роста, состава и концентрации токсикантов и продолжительности их действия. Обзор исследований, представленных в общей статье, показывает, что тяжелые металлы оказывают значительное негативное влияние на рост растений. Изучение растений, особенно используемых в пищевых целях, очень важно для максимальной профилактики этих процессов. В связи с этим целью исследования было определение влияния тяжелых металлов на пигментную систему сортов кукурузы. Мы наблюдали влияние ионов тяжелых металлов на фотосинтетические пигменты, устойчивые и непереносимые сорта 14-дневных сортов кукурузы (Туран-170, Туран-480, Казахстан-435, Тауелсиздик-20). В ходе эксперимента сделан вывод, что сорта Туран-170, Туран-480, Тауелсиздик-20 устойчивы к кукурузе по содержанию каротиноидов, хлорофилла-а, пигментов хлорофилла-в в сортах кукурузы, а Казахстан-435 – нетерпимы. Это связано с тем, что Казахстан-435 может иметь сортовые характеристики.

В целом тяжелые металлы негативно действуют на растения, снижают содержание хлорофилла и каротиноидов, вызывают сдвиги в структуре мембран хлоропластов, что отрицательно сказывается на интенсивности фотосинтеза.

**Ключевые слова:** хлорофилл, каротиноид, пигмент, тяжелый металл, фотосинтез, кадмий, кукуруза, растения.

## **Introduction**

One of the main pollutants currently observed in all natural environments is heavy metals. This is partly due to the biological activity of metals. In addition, they do not undergo transformation like organic compounds, and are stored for a long time when entering the biochemical cycle [1].

Contamination of the soil over the natural level by Pb, Zn, Cr and Co could be one of the indicators of anthropogenic environmental pollution. Fast development of industry, continuously increasing population, and intensification of road traffic are regarded as the foremost causes of ecosystem pollution in urban areas [2].

Heavy metals, such as cadmium, copper, lead, chromium and mercury are major environmental pollutants, particularly in areas with high anthropogenic pressure. Heavy metal accumulation in soils

is of great concern in agricultural production due to the adverse effects on food safety and marketability, crop growth due to phytotoxicity, and environmental health of soil organisms. The influence of plants and their metabolic activities affects the geological and biological redistribution of heavy metals through pollution of the air, water and soil. A common consequence of heavy metal toxicity is the excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) and methylglyoxal (MG), both of which can cause peroxidation of lipids, oxidation of protein, inactivation of enzymes, DNA damage and/or interact with other vital constituents of plant cells. This review focuses on effect of heavy metals on plant growth, yield and their mode of toxic effects in plants[3].

In the case of certain eco groups of the environment, the highest concentration of heavy metals is in the soil, which is primarily caused by the atmosphere. Heavy metals often enter the atmosphere

as dust that rises from the ground. Therefore, when snow and rain fall from the atmosphere to the earth's surface, they often contain lead, cadmium, arsenic, etc. elements. The main pollutants are power plants, smelters, the oil industry, construction metals companies and automobiles. Nitrogen, lead oxides, hydrocarbons, etc. are used during the operation of internal combustion engines. Substances are released and fall to the soil surface. In this case, after the substances enter the soil, the substance enters the circulation through the food chain.

Toxins accumulate in the soil, causing changes in its chemical composition, which disrupts the life of living organisms and the environment [4].

Common source of soil and plant contamination with heavy metals is traffic [5].

Heavy metals are among the most serious environmental pollutants due to their high toxicity, abundance and ease of accumulation by various plant and animal organisms. Persistent increase of heavy metals in harbour sediments can be attributed to the contribution of effluent from waste water treatment plants, industries, mining, power stations, agriculture [6].

Studied environmental risk assessment and remediation of soils contaminated due to waste disposal from tannery industries in Tamil Nadu and Kanpur (India), [7].

The accumulation risk of heavy metals in soil and vegetable crop irrigated with sewage water in a specific area of Saudi Arabia [8]. The contaminated soil effected by pollutants and toxic metals on edible plants irrigated by sewage water in their various studies [9-10].

Heavy metals are metals that poison organisms when released into the environment in large quantities. In recent years, this term refers only to the following elements: lead, zinc, cadmium, mercury, molybdenum, manganese, nickel, tin, cobalt, titanium, copper, vanadium. When these elements enter the environment, they do not decompose in the process of self-cleaning of ecosystems. They accumulate in the soil, pass on to plants and then enter the biological cycle. Biological chain: soil – plant – man, soil – water – man and soil – atmospheric air – are known to pass through the human body and cause various diseases.

Many regions of the country are polluted with gaseous, liquid and solid industrial wastes, sulfates and heavy metals. Due to the high pollution level of the environment with harmful substances, special attention is paid to the study of their impact on soil, water, air, damage and biological role. Large amounts of various chemical compounds and heavy

metals fall into the soil of the areas where the production centers are located. Soil resources are one of the most important prerequisites for life on earth. However, we do not appreciate its true significance and role. Soil is one of the components of the biosphere, a biochemical environment for humans, animals and plants, which is a very high energy reserve, a very important reserve of mechanisms of self-cleaning processes that can balance the direct and indirect effects of soil biota and humans. The conditions necessary for the production of food for humans and animal feed are created only through the soil. Soil is a natural resource that cannot be exchanged for anything. To date, science has not yet been able to find artificial material that can replace soil. No method of growing plants without soil can play the soil role. Therefore, the most important issue facing human society and still remains important is to create the best conditions for the spontaneous regeneration and preservation of soil in the soil formation process [11].

The accumulation of heavy metals in plants depends on the specifics of each species. Studies have shown that the amount of heavy metals in soils and plants in the area close to copper smelting is much higher than in the control area. The amount of copper increases up to 12 times, and the amount of other elements increase up to 2-5 times. In addition, the content of heavy metals other than zinc is much higher in the soil than in plants. However, if the amount of heavy metals in the soil increases by 2-3 times, their content in plants increases by 5-6 times. According to statistical analysis, there is a direct correlation between soil and plants [12]. Morphopathogenesis of leaves and all plants is observed in the ventilated area of harmful residues. Damage to the leaves is observed in the form of necrosis with changes in shape and color, as well as chlorosis, jaundice, loss of turgor, withering without discoloration, falling without change or slight external damage [13].

The presence of heavy metals in water degrades their quality, which eventually affects human health [14].

Industrial dust in heavily polluted areas also has a significant negative impact on plants. Large particles of dust (5-10  $\mu\text{m}$  / km) mechanically affect the surface organs of plants. In addition to damaging the buds, flowers, and leaves (cutting), the dust can also damage the bark, causing it to crack and peel. Peeled wood loses water in the body and begins to dry out, the function of potassium is impaired, i.e. the viability of the whole plant organism decreases [15].

Heavy metals in the soil refers to some significant heavy metals of biological toxicity, including mercury (Hg), cadmium (Cd), lead (Pb), chromium (Cr), and arsenic (As), etc. With the development of the global economy, both type and content of heavy metals in the soil caused by human activities have gradually increased in recent years, which have resulted in serious environment deterioration

The toxicity of heavy metals is manifested in many ways when plant cells accumulate them at high levels. Heavy metals can be divided into two groups: redox active (Fe, Cu, Cr, Co) and redox inactive (Cd, Zn, Ni, Al, etc.). The redox active heavy metals are directly involved in the redox reaction in cells and result in the formation of  $O_2^{\bullet-}$  and subsequently in  $H_2O_2$  and  $\bullet OH$  production via the Haber-Weiss and Fenton reactions (Schutzenhubel and Polle, 2002). Exposure of plants to redox inactive heavy metals also results in oxidative stress through indirect mechanisms such as interaction with the antioxidant defense system, disruption of the electron transport chain, or induction of lipid peroxidation [16].

Recently, self-cleaning of ecosystems, even if the influx of heavy metals into them has stopped, is due to the excessive amount of metals that have accumulated in the soil and are fixed in its stable components.

Plants with weakened immunity due to natural stresses are highly sensitive to anthropogenic pollution. When alfalfa is exposed to a solution containing zinc and cadmium, its growth slows down, causing symptoms of chlorosis and necrosis between the nerves [17].

Metals cause a wide range of genetic changes. One metal cell can damage several places. For example, cadmium damages DNA molecules, destroys lysosomes, inhibits DNA repair, disrupts the synthesis of replication enzymes, changes the structure of DNA. High levels of copper alter conformation and stimulate DNA and RNA synthesis [18,19]. The reaction of plant species to heavy metals is observed at all levels of organization, i.e. at the cellular, organic and population levels. At the cellular level, there is a change in the activity of cell membrane damage as a common stress associated with excess heavy metals. At the organismal level, morphological and physiological lesions are observed in individual parts of the plant, i.e. necrosis of leaves, changes in shape, shoots withering, plant growth slowing. In damaged leaves, the covering tissue and mechanical tissue, the cell layer of the epidermis is weakly developed and the cuticle is thin, the full development cycle is disrupted under the industrial pollution influence [20].

It can be concluded that, besides the anthropogenic pollution, which is reflected in the excessive use of plant protection products and fertilizers, and also the impact of air pollution from motor vehicles in certain sections of the examined area, the dominant influence on concentration of some examined elements comes from geochemical composition of parent material from which the soils were developed. [21].

Copper is a trace element necessary for plant life. However, excessive accumulation of copper in the plants body slows down the development and growth of the root system, slow growth of above-ground plants parts and pale leaf tips. As a result of pathological changes caused by excess copper, the yield of cultivated plants decreases sharply [22].

Large amounts of cadmium have been found in plants growing along highways. A similar situation is observed in plants grown near industries that pollute the environment with this toxicant. Accumulation signs of excess cadmium are reddish-brown color of the tips and tips of the plant leaves. The leaves shrink or fall off, the plants growth slows down. If the amount of cadmium in the soil exceeds 30 mg / kg, it destroys plant life. Large amounts of cadmium are released into the soil during the extraction and processing of zinc ores [23,24]. Plant growth inhibition due to cadmium is due to the weakening of the photosynthesis process. The presence of 96 mg of cadmium in 1 kg of leaves reduces the growth rate by 50% [26].

A review of the above research shows that heavy metals have a significant negative impact on plant growth. In the maximum prevention of these processes, the study of plants, especially those used for food purposes, is very important. In this regard, the purpose of the study is to study the effect of heavy metals on the pigment system of corn varieties.

### Object and method of research

Object of research: varieties of corn (*Zea mays*): Turan-170, Turan-480, Kazakhstan-435, Tauelsizdik-20.

As heavy metals: copper –  $CuSO_4$  and  $CdSO_4$  – solutions of cadmium of different concentrations (3 mg / l, 5 mg / l, 10 mg / l) and 175 ml of distilled water  $H_2O$  were obtained in each container.

In order to determine the effect of heavy metals in water on the corn plant, copper - $CuSO_4$  and  $CdSO_4$ -cadmium are grown, the required amount of seeds from 4 varieties is taken for control and cleaned several times with distilled water. In addi-

tion, in order to clean the grain from harmful microorganisms, corn seeds are soaked in a solution of potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>) for 10 minutes and shaken again with distilled water. Grains of corn varieties are prepared in three versions in 50 pieces in containers filled with salt solution of different concentrations. The germination energy was monitored for 3 days, 5 days and 7 days from the date of sowing of corn varieties, and the amount of pigment was determined for 14 days of germination.

To obtain an alcoholic solution of pigments, 20 mg of leaf was crushed in a porcelain dish to obtain a light and homogeneous mass. The precipitate was poured into centrifuge tubes, shaken with 2 ml of 90% alcohol, and centrifuged for 7 minutes at 6-7 thousand revolutions. The liquid on the surface of the centrifuge tubes was poured into a 10 ml test tube and all the liquid in the test tube was made up to the same volume, and the pigment content of this solution was determined spectrophotometrically [26]. Chlorophyll concentration was determined by spectrophotometric analysis on a photometer-KFK-3, chlorophyll "a" and chlorophyll "b" according to the following Vernon formula.

$$C_{\text{хл A}} = 11,63 * D_{665} - 2,39 * D_{649}$$

$$C_{\text{хл B}} = 20,11 * D_{649} - 5,18 * D_{665}$$

$$C_{\text{хл A+хл B}} = 6,45 * D_{665} + 17,72 * D_{649}$$

where: C – a, b chlorophylls and carotenoid concentrations mg / l,

D-wavelengths 440.5; 649; 665 nm,

The amount of carotenoids was calculated according to the Holm-Vetstein formula.

$$C_{\text{кар}} = 4,695 D_{440,5} - 0,268 C_{(\text{хл. a+хл. b})}$$

After determining the concentration of pigments in the extract, taking into account the weight (mass) of the test material and the volume of the extract, the amount of pigments in the test material was determined by the following formula:

$$A = C * V / P * 1000$$

where, the concentration of pigments obtained in C-mg / l;

Volume of V-pigment extract in ml;  
A-mg / g weight of pigments in plant material;  
P-weight of plant material / gram.

In the laboratory, the yield and growth energy of corn varieties were determined 14 days after planting.

## Results and Discussion

In general, heavy metals have a negative effect on plants, reduce the content of chlorophyll and carotenoids, cause shifts in the structure of chloroplast membranes, which negatively affects the intensity of photosynthesis [27].

Toxic effects of heavy metals on plants: disruption of growth processes, cell division, developmental disorders and morphological structures; free radical oxidation and lipid peroxidation, inhibition of photosynthetic processes in plants and damage to the photosynthetic apparatus [28].

Of great importance in the study of the state of plants is the study of the amount of pigment during photosynthesis and its ability to adapt to changes in environmental conditions. Certain indicators of the plant's response to changes in environmental conditions, the degree of their adaptation to new environmental conditions, the presence of the main photosynthetic photoreceptors in the cell, the amount of chlorophyll and carotenoids [11].

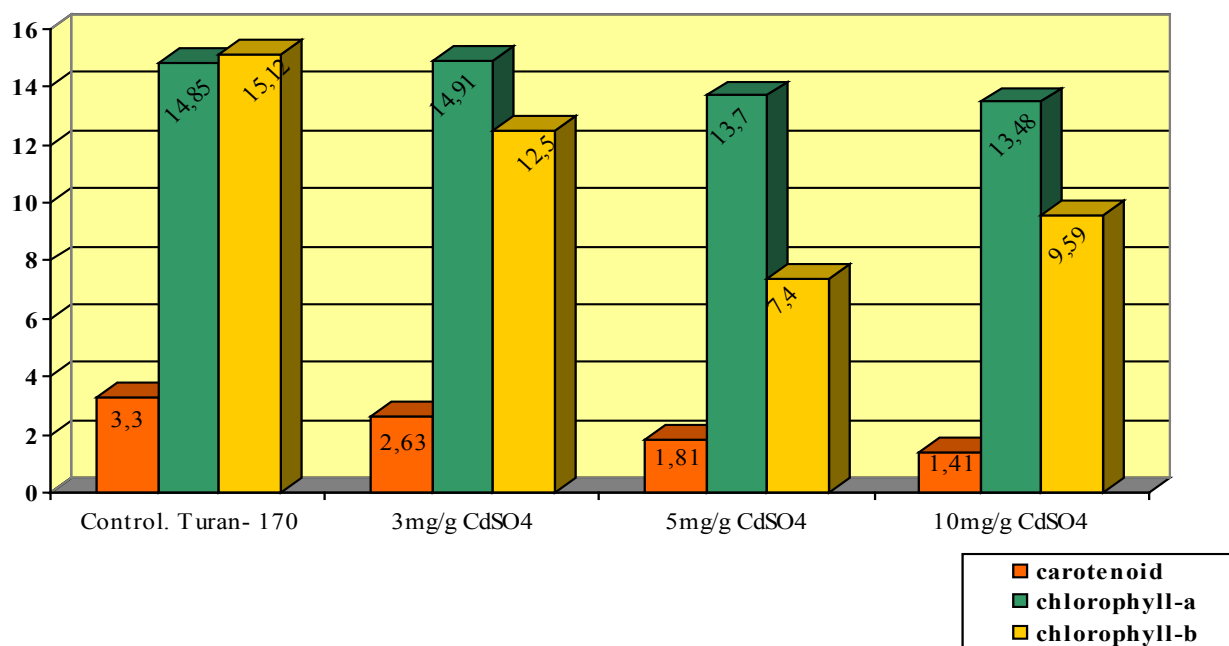
The amount of pigment in the leaves obtained from 14-day-old shoots of Turan-170 variety was significantly lower than in the control variant (control 3.3 > 3 mg / g. 2.63 > 5 mg / g. 1.81 > 10 mg / g. 1.41). . It is obvious that the value of chlorophyll-a depends on heavy metal ions, because the value of chlorophyll-a began to decrease (control 14.85 > 3 mg / g. 14.91 > 5 mg / g. 13.7 > 10 mg / g. 13.48. >). Chlorophyll-b was reduced compared to the control version and at a concentration of 10 mg / g chlorophyll-b pigment 5 mg / g con. (control 15.12 > 3 mg / g. 12.5 > 5 mg / g. 7.4 > 10 mg / g. 9.59). That is, Turan-170 variety is resistant to heavy metal ions (Figure 2).

The amount of pigment in the 14-day leaf growth of Turan-480 was declining. Carotenoid, chlorophyll a and b pigment levels decreased from top to bottom with control values of 4.78 > 3 mg / g > 3.89, 5 mg / g > 3.48, 10 mg / g > 2.92. Due to the action of heavy metal ions, Turan-480 is resistant (Figure 3).

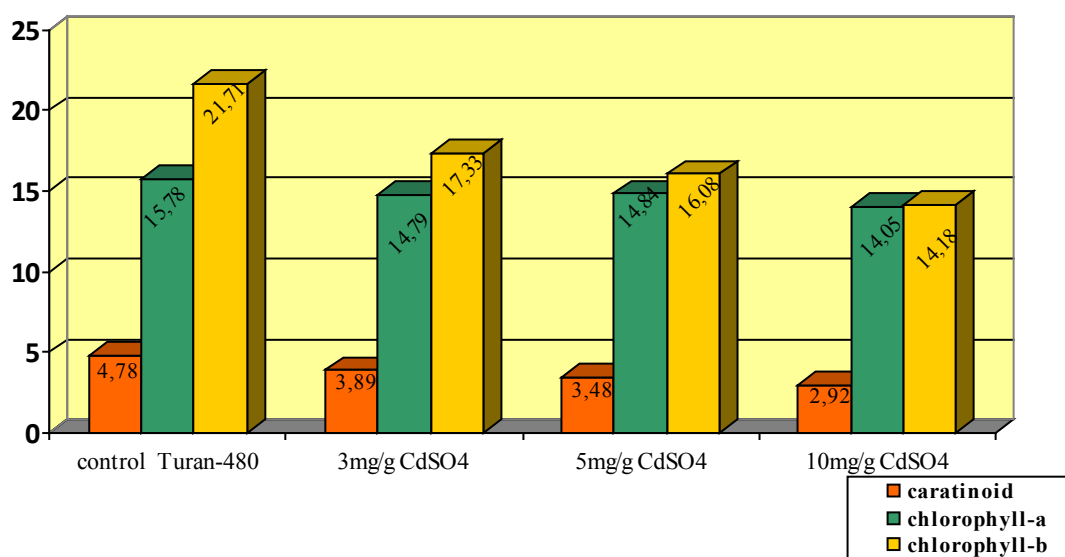




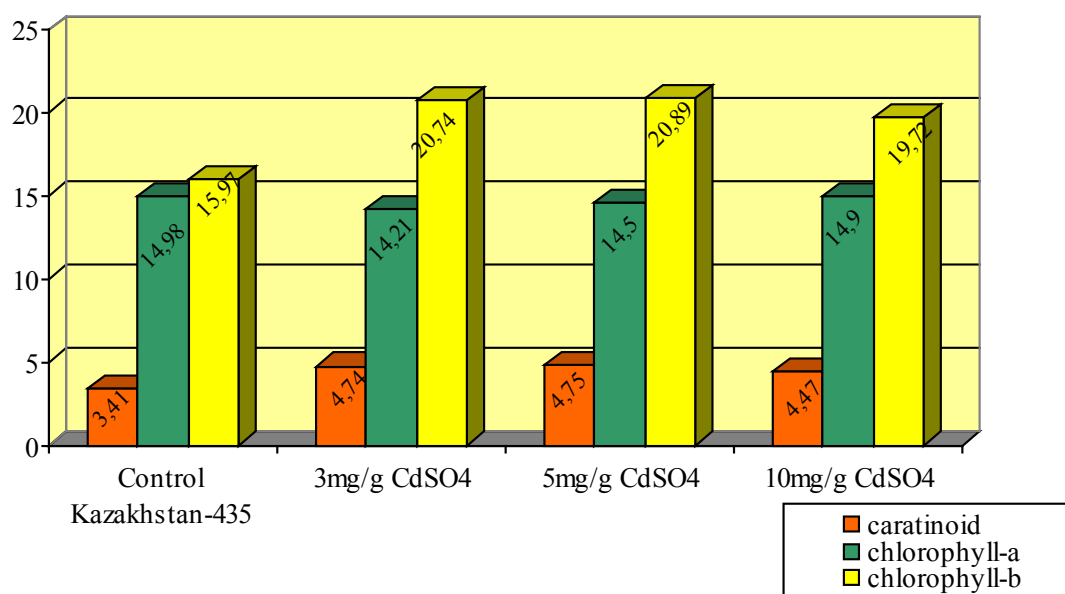
**Figure 1** – The course of experimental work to determine the effect of heavy metals on the pigment system of corn varieties in the laboratory



**Figure 2** – The effect of cadmium sulfate on photosynthetic pigments in 14-day-old seedlings of Turan-170.



**Figure 3** – The effect of cadmium sulfate on photosynthetic pigments in 14-day seedlings of Turan-480.



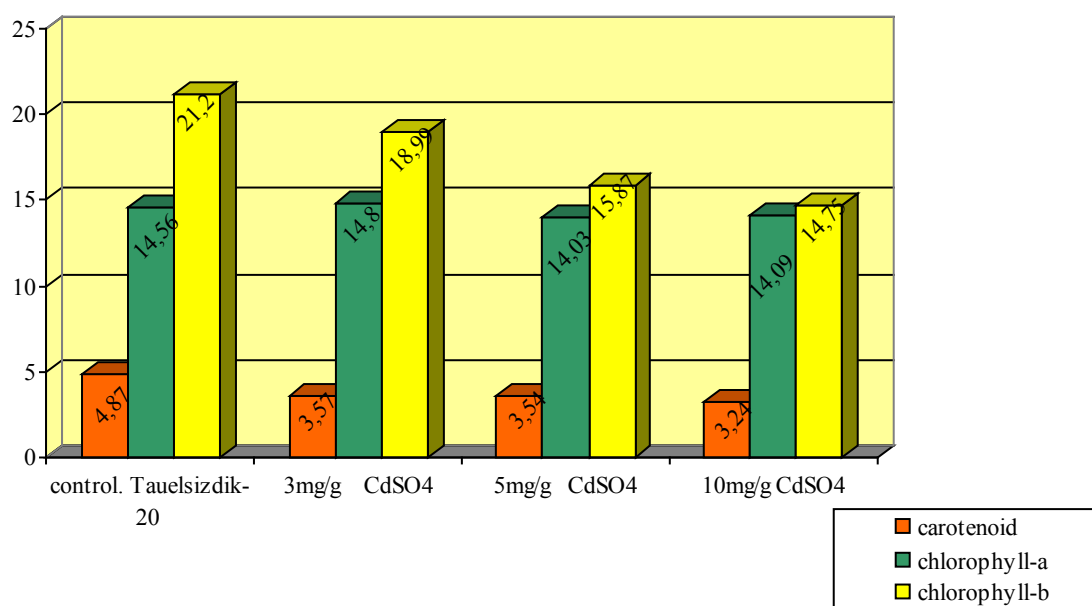
**Figure 4** – The effect of cadmium sulfate on photosynthetic pigments in 14-day seedlings of Kazakhstan-435 variety.

Pigment levels in the leaf samples of Kazakhstan-435 varied, the chlorophyll-b value increased compared to the control version, because during the experimental control, the leaves of Kazakhstan-435 variety began to turn yellow after 10 days, i.e. intolerance to heavy metal ions (Fig. 4).

The pigment in the leaves of the Tauelsizdik-20 corn variety decreased in the amount of carotenoids, chlorophyll-a, chlorophyll-b (Figure 5).

As can be seen from the data in the diagram, it is clear that the photosynthetic pigments in the seedlings of corn varieties depend on the concentration of heavy metals.

Compared to the control version, it is clear that the synthesis of photosynthetic pigments in the seedlings of cadmium sulfate Turan-170, Turan-480, Tauelsizdik-20 varieties decreased under the influence of heavy metals.



**Figure 5** – The effect of cadmium sulfate on photosynthetic pigments in 14-day seedlings of Independence-20 variety.

Compared to the control version, the concentration of carotenoids decreased from 3.3 to 1.18-1.41  $\mu\text{g} / \text{g}$ . However, as the concentration of the heavy metal increased, the effect of the heavy metal became more pronounced.

Such indicators are clearly reflected in the varieties Turan-480, Tauelsizdik-20. Only, an increase in the synthesis of FS (photosynthetic) pigments of Kazakhstan -435 variety (carotenoid control from 3.14 to 4.74-4.47  $\mu\text{g} / \text{g}$ ) and (Hlv from 15.97 to 20.74-19.72  $\mu\text{g} / \text{g}$ ) may have varietal characteristics of plants. In general, we observed in experiments that the growth and germination of corn varieties undergo 10mg / g of cadmium sulfate is subject to physiological changes. It can occur due to dehydration of the leaf blade under the influence of salts of heavy metals. Such physiological processes need to be identified by individual studies. So, to summarize, the corn varieties include Turan-170, Turan-480, Tauelsizdik-20 heavy metal-resistant varieties. Kazakhstan-435 variety exceeded the control version, as mentioned above, the leaves were dark

green, pink-brown, ie did not show resistance to heavy metal ions.

### Conclusion

The effect of heavy metal ( $\text{CdSO}_4$ ) on the composition of photosynthetic pigments in corn varieties. In general, heavy metals were obtained to determine the composition of photosynthetic pigments and resistant and non-resistant varieties of corn (Turan-170, Turan-480, Tauelsizdik-20, Kazakhstan-435). Due to the increase in the concentration of  $\text{CdSO}_4$ , the concentration of chlorophyll a and b, carotenoids decreased. We noticed that the photosynthetic pigments Turan-170, Turan-480, Tauelsizdik-20 had a higher content of resistant corn than Kazakhstan-435, which is not resistant to heavy metals. The composition of photosynthetic pigments directly affects the rate of photosynthesis, ie determines the productivity of crops. The composition of photosynthetic pigments is an indicator of plants resistant to growing in an unfavorable environment (control version 3 mg / g, 5 mg / g, 10 mg / g).

### References

- 1 Тулебаев Р.К., Хроническая свинцовая интоксикация. — Алматы: Ғылым, 1995. – с.9-11.
- 2 Jankiewicz, B. and D. Adamczyk ,2010 Assessing Heavy Metal Content in Soils Surrounding a Power Plant. Short communication, Polish Journal of Environmental Studies, 19 (4): 849-853
- 3 Mukti Gill. Heavy metal stress in plants: a review. International Journal of Advanced Research ISSN 2320-5407 (2014), Volume 2, Issue 6, 1043-1055

- 4 Нұрғызарынов А., Атыраулық экотоптардың химиялық экологиясы (Сырдың төменгі ағысы). — Қызылорда.: «Тұмар», 2003
- 5 Gworek, B., A. Deckowska and M. Pierscieniak, 2011. Traffic Pollutant Indicator: Common Dandelion (*Teraxacum Officinale*), Scots Pine (*Pinus Silvestris*), Small-Leaved Lime (*Tilia Cordata*). Polish Journal of Environmental Studies, 20 (1): 87-92.
- 6 Guevara-Riba A, Sahuquillo A, Rubio R, Rauret G (2004) Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Sci Total Environ* 321: 241-255.
- 7 Srinivasarao Ch, Venkateswarlu B, Rattan Lal (2012) Sustaining agronomic productivity and quality of a Vertisolic soil (Vertisol) under soybean-safflower cropping system in semi-arid central India. *Canadian Journal of Soil Science* 92(5): 771-785.
- 8 Alghobar MA, Suresha S (2017) Evaluation of metal accumulation in soil and tomatoes irrigated with sewage water from Mysore city, Karnataka, India. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16(1): 49-59.
- 9 Ansari MI, Malik M (2007) Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresour Technol* 98(16): 3149-3153.
- 10 Aslam J Khan SA, Khan SH (2013) Heavy metals contamination in roadside soil near different traffic signals in Dubai, United Arab Emirates, *Journal of Saudi Chemical Society* 17(3): 315-319.
- 11 Тужилкина В.В. Реакция пигментной системы хвойных на длительное аэротехногенное загрязнение. // *Экология*, 2009, № 4, с. 243-248
- 12 Артамонов В.И. Растения и чистота природной среды. — Москва: Наука, 1986. -с.27-34.
- 13 Романова С.М., Нурахметов Н.Н., Батаева К.О. Экологические аспекты загрязнения токсичными веществами поверхностных вод Казахстана // *Химия. Охрана окружающей среды. Экология человека*. — 1997. N4. — С.42.
- 14 Shalini Arora, C K Jain and R S Lokhande. Review of Heavy Metal Contamination in Soil .*International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* ISSN -2572-1119. July 31, 2017. 3Int J Environ Sci Nat Res 3(5): IJESNR. MS.ID.555625 (2017)
- 15 Давидович Г.Т., Сахатов Г.С., Давидович С.Г. Региональное загрязнение природной среды Актюбинской обл. // *Химия. Охрана окружающей среды. Экология человека*. — 1996. -N3-4. -С.72.
- 16 Chao Su , LiQin Jiang , WenJun Zhang. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques *Environmental Skeptics and Critics*, 2014, 3(2): 24-38 IAEEES [www.iaees.org](http://www.iaees.org)
- 17 Рахыпбеков Т.К. Роль гигиенических факторов экологические благополучного города в совершенствовании системы управления здравоохранением. // Автореферат канд.диссерт. — Алматы, 1996.
- 18 Савельев М.Б. Экофизиологические исследования фитотронов для разработки методов контроля загрязнения водной среды тяжелыми металлами. / *Вестник Московского Университета*. — 1999. Серия 16, -N2. -С.42-47.
- 19 Кабате- Пендиас А. Микроэлементы в почвах и растениях. — М., 1989. -8-204 с.
- 20 Дубинин Н.П., Засухина Г.Д. Защитные механизмы клетки в условиях загрязнения окружающей среды // *Вестник АН СССР*. М., 1975. -N11. -С.76-77.
- 21 R. PiviC, A. StanojkoviC-Sebi C, D. JoSi C and Z. DiniC . Evaluation of the heavy metals content in soil and plant material at different distances from the motorway E75 in the section Belgrade-PreSevo (SERBIA) .*Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (No 2) 2014, 330-336 Agricultural Academy
- 22 Битнерович А // *Охрана природы и воспроизводства природных ресурсов* М 1999 № 4 С-45.
- 23 Бахиев А. Воздействие буревых рпабот на растительность // *Воздействие техногенных факторов на растительный покров Каракалпастана ташкент* 1992, С 68-83 .
- 24 Микшевич Н.В. Ковальчук Л.А. тяжелые металлы в системе посева растения животные в зоне действия медплавильного предприятия // *Матер 2-ой всесоюзной международной конференции по ТМ в окр и охр. Природы* М. 1988 г С 127-129.
- 25 Дубинин Н.П. Засухина Г.Д. Защитные механизмы клетки в условиях загрязнения окружающей среды. // *Вестник АН СССР* М 1975 № 11 С76-77.
- 26 Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. В кн. *Биохимические методы в физиологии растений/ под ред. О.А. Павлиновой*. – М.: Наука, 1971. – С. 154-170.
- 27 Титова М.С. Реакция пигментной системы сосны обыкновенной (*pinus sylvestris* l.) На загрязнение окружающей среды. // *Естественные и технические науки* . 2010 стр-122-124
- 28 Е.А. Ерофеева, М.М. Наумова Взаимосвязь физиолого-морфологических показателей листовой пластинки березы повислой с содержанием в ней тяжелых металлов // 2010 г. *Биология Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*, 2010, № 1, с. 140–143

#### References

- 1 Tulebaev R.K., Hronicheskaya svincovaya intoksikaciya. – Almaty: Fylym, 1995. – s.9-11.
- 2 Jankiewicz, B. and D. Adamczyk ,2010 Assessing Heavy Metal Content in Soils Surrounding a Power Plant. Short communication, *Polish Journal of Environmental Studies*, 19 (4): 849-853
- 3 Mukti Gill. Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research* ISSN 2320-5407 (2014), Volume 2, Issue 6, 1043-1055
- 4 Нұрғызарынов А., Атыраулық экотоптардың химиялық экологиясы (Сырдың төменгі ағысы). – Қызылорда.: «Тұмар», 2003
- 5 Gworek, B., A. Deckowska and M. Pierscieniak, 2011. Traffic Pollutant Indicator: Common Dandelion (*Teraxacum Officinale*), Scots Pine (*Pinus Silvestris*), Small-Leaved Lime (*Tilia Cordata*). Polish Journal of Environmental Studies, 20 (1): 87-92.

- 6 Guevara-Riba A, Sahuquillo A, Rubio R, Rauret G (2004) Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain. *Sci Total Environ* 321: 241-255.
- 7 Srinivasarao Ch, Venkateswarlu B, Rattan Lal (2012) Sustaining agronomic productivity and quality of a Vertisolic soil (Vertisol) under soybean-safflower cropping system in semi-arid central India. *Canadian Journal of Soil Science* 92(5): 771-785.
- 8 Alghobar MA, Suresha S (2017) Evaluation of metal accumulation in soil and tomatoes irrigated with sewage water from Mysore city, Karnataka, India. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16(1): 49-59.
- 9 Ansari MI, Malik M (2007) Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresour Technol* 98(16): 3149-3153.
- 10 Aslam J Khan SA, Khan SH (2013) Heavy metals contamination in roadside soil near different traffic signals in Dubai, United Arab Emirates, *Journal of Saudi Chemical Society* 17(3): 315-319.
- 11 Tuzhilkina V.V. Reakciya pigmentnoj sistemy hvojninyh na dlitel'noe aerotekhnogennoe zagryaznenie. // *Ekologiya*, 2009, №4, s. 243-248
- 12 Artamonov V.I. Rasteniya i chistota prirodnoj sredy. – Moskva: Nauka, 1986. -s.27-34.
- 13 Romanova SM., Nurahmetov N.N., Bataeva K.O. Ekologicheskie aspekty zagryazneniya toksichnymi veshchestvami poverhnostnyh vod Kazahstana // *Himiya. Ohrana okruzhayushchej sredy. Ekologiya cheloveka.* – 1997. N4. – S.42.
- 14 Shalini Arora, C K Jain and R S Lokhande. Review of Heavy Metal Contamination in Soil .*International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* ISSN -2572-1119. July 31, 2017. 3Int J Environ Sci Nat Res 3(5): IJESNR. MS.ID.555625 (2017)
- 15 Davidovich G.T., Sahatov G.S, Davidovich S.G. Regional'noe zagryaznenie prirodnoj sredy Aktyubinskoj obl. // *Himiya. Ohrana okruzhayushchej sredy. Ekologiya cheloveka.* – 1996. -N3-4. -S.72.
- 16 Chao Su , LiQin Jiang , WenJun Zhang. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques *Environmental Skeptics and Critics*, 2014, 3(2): 24-38 IAEES [www.iaees.org](http://www.iaees.org)
- 17 Rahypbekov T.K. Rol' gigienicheskikh faktorov ekologicheskine blagopoluchnogo goroda v sovershenstvovanii sistemy upravleniya zdravohraneniem. // *Avtoreferat kand.dissert.* – Almaty, 1996.
- 18 Savel'ev M.B. Ekofiziologicheskie issledovaniya fitotronov dlya razrabotki metodov kontrolya zagryazneniya vodnoj sredy tyazhelymi metallami. / *Vestnik Moskovskogo Universiteta.* – 1999. Seriya 16, -N2. -S.42-47.
- 19 Kabate- Pendas A. Mikroelementy v pochvah i rasteniyah. – M., 1989. -8-204 s.
- 20 Dubinin N.P., Zasuhina G.D. Zashchitnye mekhanizmy kletki v usloviyah zagryazneniya okruzhayushchej sredy // *Vestnik AN SSSR. M.*, 1975. -N11. -S.76-77.
- 21 R. Pivić, A. Stanojković-Sebić, D. Jošić and Z. Dinić . Evaluation of the heavy metals content in soil and plant material at different distances from the motorway E75 in the section Belgrade-PreSevo (SERBIA) .*Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (No 2) 2014, 330-336 *Agricultural Academy*
- 22 Bitnerovich A // *Ohrana prirody i vosproizvodstva pripodnyh resursov* M 1999 № 4 S-45.
- 23 Bahiev A. Vozdejstvie burevnyh rpadot na rastitel'nost' // *Vozdejstvie tekhnogennyh faktorov na rastitel'nyj pokrov Karakalpakstana tashkent* 1992, S 68-83 .
- 24 Mikshevich N.V. Koval'chuk L.A. tyazhelye metally v sisteme poseva rasteniya zhivotnye v zone dejstviya medplavil'nogo predpriyatiya // *Mater 2-oj vsesoyuznoj mezhdunaodnoj konferencii po TM v okr i ohr. Prirody M.* 1988 g S 127-129.
- 25 Dubinin N.P., Zasuhina G.D. Zashchitnye mekhanizmy kletki v usloviyah zagryazneniya okruzhayushchej sredy. // *Vestnik AN SSSR M* 1975 № 11 S76-77.
- 26 SHlyk A.A. Opredelenie hlorofillov i karotinoidov v ekstraktah zelenykh list'ev. V kn. *Biohimicheskie metody v fiziologii rastenij/ pod red. O.A. Pavlinovoj.* – M.: Nauka, 1971. – C. 154-170.
- 27 Titova M.S. Reakciya pigmentnoj sistemy sosny obyknovvennoj (pinus sylvestris l.) Na zagryaznenie okruzhayushchej sredy. // *Estestvennye i tekhnicheskie nauki* . 2010 str-122-124
- 28 E.A. Erofeeva, M.M. Naumova Vzaimosvyaz' fiziologo-morfologicheskikh pokazatelej listovoj plastinki berezy povislj s sodержaniem v nej tyazhelyh metallov // 2010 g. *Biologiya Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*, 2010, № 1, s. 140–143

A.A. Sumbembayev<sup>1,2\*</sup> , E.V. Matveeva<sup>1</sup> , A.B. Abdeshova<sup>1,3</sup> 

<sup>1</sup>Altai Botanical Garden, Natural flora Lab, Kazakhstan, Ridder

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>S. Seifullin Kazakh AgroTechnical University, Kazakhstan, Nur-Sultan

\*e-mail: aydars@list.ru

## PRIMARY INTRODUCTION RESULTS OF THE GENUS *DACTYLORHIZA* NECKER EX NEVSKI IN THE ALTAI BOTANICAL GARDEN

The article presents the results of the primary introduction of species of the genus *Dactylorhiza* Necker ex Nevski in the Altai Botanical Garden. The primary introduction resulted in a stable collection of 4 species of the genus *Dactylorhiza*: *D. fuchsii* (Druce) Soo, *D. incarnata* (L.) Soo, *D. maculata* (L.) Soo, *D. umbrosa* (Kar. & Kir.) Nevski. Individuals of *D. incarnata* showed plasticity and good adaptability to conditions of culture. Their morphometric indicators of the length of the inflorescence increased by 14%, and the number of flowers in the inflorescence by 52%, indicators of the length and width of the basal leaves by 108% and 23% respectively. In the case of *D. umbrosa* almost all morphometric parameters were reduced. There is an increase of the number of flowers per inflorescence – 73%. The rest of the indicators were reduced by an average of 29%. *D. fuchsii* showed a 57% increase in flowers per inflorescence; the indices of the length of the basal leaves and the length of the stem leaves remained almost unchanged, and the width of the stem leaves increased by 23%. Indicators of *D. maculata* decreased very significantly. The height of the plant decreased by 43%, the length of the inflorescence by 41%, the length of the basal leaves by 27% and the length of the stem leaves by 30%. The main limiting factors for the introduction were identified: strong solar insolation, dry air, poverty and soil acidity. The results of the study have of great importance for the development of introduction agricultural technology of rare and endangered plants in the mountain taiga zone of East Kazakhstan, contribute to the preservation of biodiversity. Due to the short-term observation, more detailed analyzes of the results will be obtained with the further continuation of the introduction experiment.

**Key words:** *Dactylorhiza* Necker ex Nevski, introduction, collection, conservation, rare species.

A.A. Сумбембаев<sup>1,2\*</sup>, E.B. Матвеева<sup>1</sup>, A.B. Абдешова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Алтай ботаникалық бағы, табиғи флора зертханасы, Қазақстан, Риддер қ.

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>С. Сейфулин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

\*e-mail: aydars@list.ru

### Алтай ботаникалық бағына *Dactylorhiza* Necker ex Nevski тұқымдасының түрлерін алғашқы енгізу нәтижелері

Мақалада Алтай ботаникалық бағында *Dactylorhiza* Necker ex Nevski тұқымдасының түрлерін алғашқы енгізу нәтижелері көрсетілген. Бастапқы енгізудің нәтижесінде *Dactylorhiza* тұқымдасының 4 түрінің тұрақты коллекциясы қалыптасты: *D. fuchsii* (Druce) Soo, *D. incarnata* (L.) Soo, *D. maculata* (L.) Soo, *D. umbrosa* (Kar. & Kir.) Nevski. Жағдайларға икемділік пен жақсы бейімділікті *D. incarnata* түрі көрсетті. Олардың гүл шоғырының ұзындығының морфометриялық көрсеткіштері 14%-ға, ал гүлшоғырындағы гүлдер саны 52%-ға, базальды жапырақтардың ұзындығы мен енінің көрсеткіштері сәйкесінше 108% және 23%-ға өсті. *D. umbrosa*-де морфометриялық көрсеткіштердің барлығы дерлік төмендеді. 73%-ға өсу тек бір гүлшоғырдағы гүлдер санында байқалды. Қалған индикаторлар орта есеппен 29% төмендеді. *D. fuchsii* бір гүл шоғырына гүлдердің 57% өсуін көрсетті; базальды жапырақтардың ұзындығы мен сабақ жапырақтарының ұзындығының көрсеткіштері өзгеріссіз қалды, ал сабақ жапырақтарының ені 23% өсті. *D. maculata* кейбір индикаторлары айтарлықтай төмендеді. Өсімдіктің биіктігі – 43%, гүлшоғырының ұзындығы – 41%, базальды жапырақтардың ұзындығы – 27% және сабақ жапырақтарының ұзындығы 30% төмендеді. Енгізудің негізгі шектеуші факторлары анықталды: күшті күн инсоляциясы, құрғақ ауа, кедейлік және топырақтың қышқылдығы. Алынған нәтижелер Шығыс Қазақстанның таулы тайга зонасында сирек кездесетін және құрып кету қаупі бар өсімдіктердің ауылшаруашылық технологиясын енгізу және зерттеу үшін үлкен маңызға ие, биоәртүрлілікті сақтауға ықпал

етеді. Қысқа мерзімді бақылаудың арқасында енгізу тәжірибесін одан әрі жалғастыра отырып, нәтижелерді толығырақ талдау жасалады.

**Түйін сөздер:** *Dactylorhiza Necker ex Nevski*, енгізу, жинау, сақтау, сирек кездесетін түрлер.

А.А. Сумбембаев<sup>1,2\*</sup>, Е.В. Матвеева<sup>1</sup>, А.Б. Абдешова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Алтайский ботанический сад, лаборатория природной флоры, Казахстан, г. Риддер

<sup>2</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup>Казахский агротехнический университет им. С. Сейфулина, Казахстан, г. Нур-Султан

\*e-mail: aydars@list.ru

### Итоги первичной интродукции видов рода *Dactylorhiza Necker ex Nevski* в Алтайском ботаническом саду

В статье представлены результаты первичной интродукции видов рода *Dactylorhiza Necker ex Nevski* в Алтайском ботаническом саду. В результате первичной интродукции была получена устойчивая коллекция из 4 видов рода *Dactylorhiza*: *D. fuchsii* (Druce) Soo, *D. incarnata* (L.) Soo, *D. maculata* (L.) Soo, *D. umbrosa* (Kar. & Kir.) Nevski. Пластичность и хорошую приспособляемость к условиям культуры показали особи *D. incarnata*. Их морфометрические показатели длины соцветия выросли на 14%, а количество цветков в соцветии – на 52%, показатели длины и ширины прикорневых листьев – на 108% и 23% соответственно. У *D. umbrosa* почти все морфометрические показатели были снижены. Увеличение на 73% было замечено только в количестве цветков в одном соцветии. Остальные показатели были снижены в среднем на 29%. *D. fuchsii* показал увеличение цветков, находящихся на одном соцветии на 57%; показатели длины прикорневых листьев и длины стеблевых листьев почти не изменились, а ширина стеблевых листьев увеличилась на 23%. Некоторые показатели *D. maculata* снизились очень значительно. Высота растения снизилась на 43%, длина соцветия – на 41%, длина прикорневых листьев – на 27% и длина стеблевых листьев – на 30%. Выявлены основные лимитирующие факторы при интродукции: сильная солнечная инсоляция, сухой воздух, бедность и кислотность почвы. Полученные результаты имеют высокое значение для изучения и разработки интродукционной агротехники редких и исчезающих растений в горно-таежной зоне Восточного Казахстана, способствуют сохранению биоразнообразия. В связи с краткосрочностью наблюдений, более подробные анализы результатов будут получены при дальнейшем продолжении интродукционного эксперимента.

**Ключевые слова:** *Dactylorhiza Necker ex Nevski*, интродукция, коллекция, сохранение, редкий вид.

## Introduction

The most universal method in the study, conservation of rare and endangered plant species in botanical gardens is the introduction [1]. The use of the introduction method for reconstruction (restoration) of natural populations is one of the most effective ways to maintain the reproduction of populations and a reliable tool for the biodiversity conservation [2].

The basis for the cultivation and conservation of rare orchid species is the development of effective methods for their reproduction. This is relevant for species that have a wide disjunctive range and reproduce well by seeds or vegetative way [3, 4, 5]. Reconstruction by the method of reintroduction by seedlings or translocation by adult plants in such species may give better results than sowing with seeds [6]. Germination of terrestrial species have requirements that are more specific and they are little researched [7, 8, 9, 10].

Terrestrial orchids may be more dependent on mycorrhizal fungi than on epiphytic species

[11]. As for *Dactylorhiza*, the rate of vegetative reproduction is very slow, and seed germination in nature is very low – from 0.2 to 0.3% [12]. One capsule contains millions of seeds without a metabolic mechanism and endosperm. Despite the very large number of produced seeds, only a few seeds germinate in nature [13]. Introduction of *Dactylorhiza* matters for many botanical gardens in many countries interested in the manufacture of salep [14, 15].

The rarity of *Dactylorhiza*, like all orchids, is due to habitat loss and climate change, but many orchids are also threatened by unsustainable (often illegal) collection of ornamental, food and medicinal species. In addition, it is difficult to compete with invasive species of grasses [16, 17]. Whereas during the introduction, conditions are created to correspond ecological requirements of the species. Moreover, the method of sod transplantation is chosen as the most successful way of transportation species into new growing conditions. The method is described in numerous literary sources [18, 19] and has proven



itself in creating artificial cenoses with the highest degree of adaptation.

According to the results of the introduction of the Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences (BIN RAS), it was confirmed that *D. fuchsii* grows well in culture (in partial shade and in open areas), without requiring special substrates. This species is easily grown *in vitro* culture from mature seeds. The seedlings develop well. Individuals easily adapt after disembarking in non-sterile conditions. They bloom 5-6 years after sowing [20].

There are 8 species of *Dactylorhiza* in Kazakhstan, among which 4 were selected for primary introduction, including *D. fuchsii* listed in the Red Book of Kazakhstan. All species are economically valuable, representatives of the biodiversity of the flora of Kazakhstan.

The beneficial properties and potential of many *Dactylorhiza* species are still being actively studied [21, 22, 23].

The purpose of this work is to analyze the results of the primary introduction of species of the genus *Dactylorhiza* to identify the most promising species and forms.

### Materials and methods

The objects of the study were representatives of the genus *Dactylorhiza* (Fig 1): *D. fuchsii* (Druce) Soo, *D. incarnata* (L.) Soo, *D. maculata* (L.) Soo, *D. umbrosa* (Kar. & Kir.) Nevski during introduction in conditions of mountain forest zone – Ridder «Altai Botanical Garden».

Primary introduction tests were carried out in 2018 – 2020.



**Figure 1** – Species of the genera *Dactylorhiza* in the primary introduction:  
A – *D. fuchsii*; B – *D. incarnata*; C – *D. maculata*; D – *D. umbrosa*



The collection of material was carried out during 3 expedition trips by the route-reconnaissance method. Studies of natural habitats were carried out in the Kurchum and Katon-Karagai administrative regions. The routes of the expeditions through the territory of South Altai passed through flat, low-mountain and mid-mountain territories, covering the ranges: South Altai, South Altai Tarbagatai, Azutau, Kurchum, Narym; Bukhtarma mountains, Chundogatui mountains; depressions: Bobrovskaya, Karakabinskaya, Katon-Karagayskaya and Markakolskaya. The valleys of the next rivers were studied: Bukhtarma, Akkaba, Kurchum, Sogornaya, Sarymsakty, Kaldzhir, Narym, Karakaba, Basterekty, Tau-Tekeli. The total length of the expeditionary routes was 4925 km.

The material was transplanted into the culture from natural habitats by living plants. Places for attraction to culture are indicated on the map-scheme (Fig. 2).

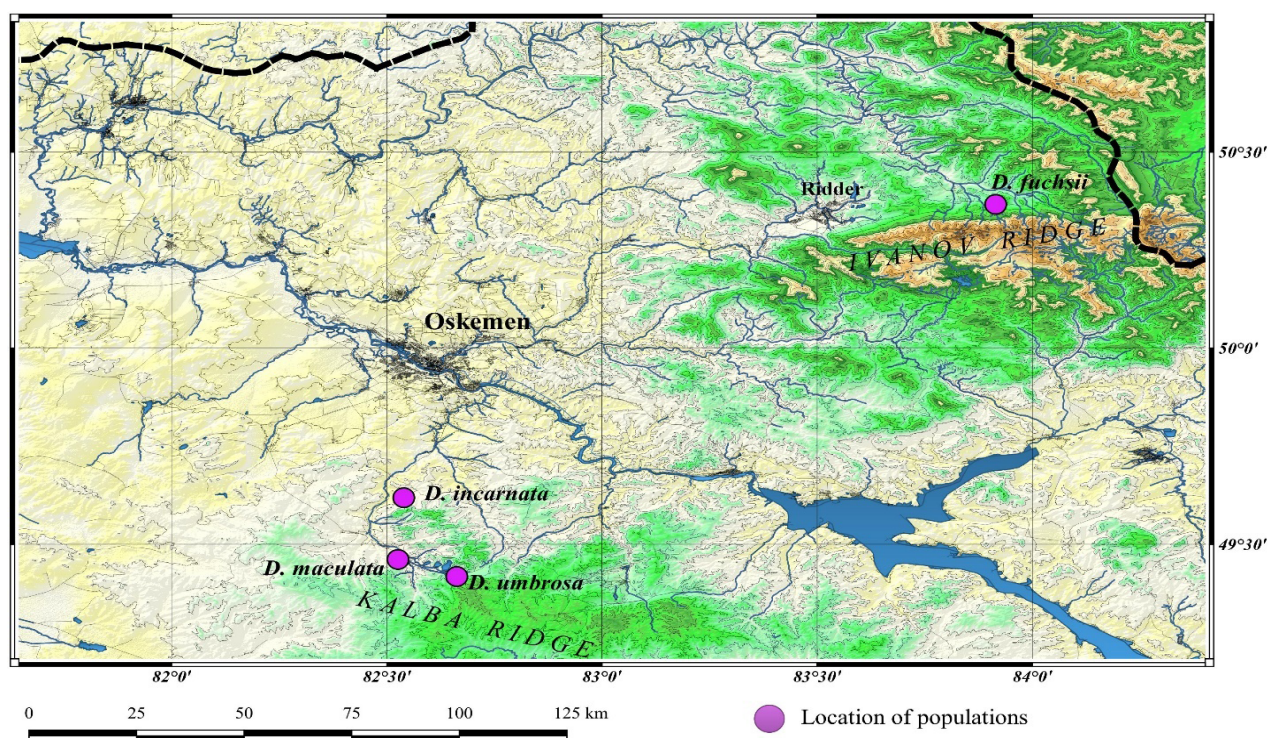


Figure 2 – Schematic map of the habitats of the species involved in the introduction.

The selection of material, principles and methods of introduction research were studied according to the method of K.A. Sobolevskaya [24] and based on the existing methods of cultivating rare plants in botanical gardens [25-30].

Individuals transported by a block of sod for better preservation of the planting material and were planted in the ground with a lump of earth to preserve mycorrhiza.

On the experimental territory of the laboratory of natural flora in the Altai botanical garden were created conditions close to natural for each plant species. The plants were planted in open areas since in nature these species grow in overly humid meadows, in moderately humid meadows with full illu-

mination throughout the day. During planting to the planting pits was added soil from the sample collection point to enrich them with microflora, including mycorrhizal fungi, which are necessary for the growth and development of orchids.

Severity of the climate in the region affects to the plants collection safety. That is why agrotechnical and maintenance measures carried out from early spring to the establishment of snow cover very important. Orchids are not able to compete with the powerful weed. Therefore, during the growing season, weeding with shallow loosening was carried out on the collection of orchids. During the summer period, there were often periods without precipitation for more than 10 days. There-

fore, the collection site has an artificial irrigation system. For the winter at the end of October, the site was covered with 3-5 cm thick linden and birch leaves to protect it from freezing and replenish the soil with organic matter.

Well-developed individuals of medium size, without signs of diseases and pests were selected for measurements. According to method of Vakhrameeva M.G. [30] for each coenopopulation, the following were determined: the number of generative and vegetative individuals, the height of the generative shoots, the number of leaves on the generative shoots, the length of the peduncle, leaf sizes, the size of the inflorescence, and the number of flowers. These indicators were determined in 20 replicates.

Due to the short duration of the study and the rather long period of ontogenesis of the studied species, such introduction parameters as: the passage of seasonal phenophases, seed productivity and seed viability were not included in the objectives of this study. The study of these parameters is foreseen at the next stage of the introduction tests.

### Research results and discussion

Republican state enterprise "Altai Botanical Garden" is located in the Leninogorsk intermountain basin of the Ubinsky (1967 m) and Ivanovsky (2776 m) ridges. The erosion-tectonic trough of the Leninogorsk depression is a consequence of the alpine orogenesis. Its structure involves rocks of the Upper Paleozoic age – clay and siliceous shales, sandstones, tuffs, limestones, granites, etc. The territory of the basin is composed of deluvial-proluvial deposits and is a slightly hilly surface [31].

The soil of the garden belongs to mountain chernozems. The humus content ranges from 6 to 8 (10%) with a high percentage of nitrogen and potassium. In the upper horizons, the soil reaction is neutral or slightly acidic; in the lower layers, it acquires an alkaline reaction. Parent rocks are the loess-like loams of various genesis [32, 33].

The climate is sharply continental, characterized by long cold winters and hot short summers.

The limiting factors for the introduction of plants in the Altai Botanical Garden are the sharp changes in temperature and humidity during the year, season and day, and a short growing season. The air temperature during the day fluctuates sharply, in winter the drop can reach 25 °C, and in summer up to 20 °C. The growing season begins with the establishment of a stable transition of

air temperature through +5 °C, and ends with the manifestation of the first autumn frosts – in the first decade of September.

The beginning of the growing season in our zone is considered to be April. Unusually warm weather in the 1st decade of April: up to +9, caused complete snow melting, and early release of the soil from snow. The average monthly air temperature was positive +5.8° C. The snow completely melted on 13 April. A stable transition of the average daily temperature through 0° C occurred on April 16, 2 weeks earlier than the long-term average date. The amount of precipitation for the month is above the norm – 71.7 mm.

Warm weather was observed in the first ten days of May. In the afternoon, the air temperature reached +24.5° C. The soil thawed violently, which completely ended at the end of the decade. There was a sharp drop in day and night temperatures.

In June, the weather was rainy. Abundant precipitation was observed: 149.2 mm, 3 times higher than the norm. The air temperature remained moderately warm: 16.8° C. The air humidity was high: 72-74%. There were no frosts in June.

In the first half of July, the weather was hot and sunny. In the first and second decades, there was practically no precipitation, and the air temperature reached +28.8° C. The top layers of the soil were dry. It rained in the third decade of the month. But they practically did not replenish the moisture reserves in the soil, and therefore the plants experienced a lack of moisture.

The weather remained hot in the first half of August. The air temperature was kept within +29.2° C. Little precipitation was noted. In the third decade of the month, the first slight frosts were observed up to –1° C on the soil surface.

Observations of the seasonal rhythm of development showed that all *Dactylorhiza* species emerge under the snow without signs of sub-snow growth. All species go through a full cycle of seasonal development and complete the growing season naturally in the first or second decades of September. The percentage of boll formation is low – 10-17.6%, due to the dry growing season.

Information about the life of these plants, the bioecological characteristics of species, the peculiarities of their relationship with the conditions of the edaphic environment reveals more fully study of the morphological structure of underground organs of *Dactylorhiza*.

*Dactylorhiza* species are tuberoid orchids. The root part of the tuberoid has finger-split tu-

bers, consisting of thickened accrete root bases, while their bases remain thin and reach up to 5-8 cm. In addition to root tubers, there are non-thickened adventitious roots of the first and second order. The seasonal development of the stem-root tuberoid is accompanied by the annual replacement of the old tuber, which is functioned in the current year, with a young one, bearing a renewal bud, from which next year will develop

an underground shoot. During the growing season, the old tuber, which functioned in the last year, shrivels, turns brown. Therefore, despite the perennial life cycle, the plant is renewed annually.

During the introduction to the site of the Altai Botanical Garden from 2015 to 2019 were involved 7 species of *Dactylorhiza*. For 2020, the collection is represented by 4 species (Table 1).

**Table 1** – Attraction of *Dactylorhiza* for introduction

| Registration number | Species name        | Year of attraction | Places of attract settlements  |
|---------------------|---------------------|--------------------|--|
| 13-19               | <i>D. fuchsii</i>   | 2017               | Southwestern Altai, Ivanovsky ridge, Gray meadow tract, Bolshaya Poperechka river valley, southwestern foothills, fir-birch edge, moistened meadow covered with moss. 50°20'38»N, 83°53'34» E, 1212 m above sea level. |
| 26-18               | <i>D. incarnata</i> | 2018               | Kalbinsky Altai, Kalbinsky ridge, Koktau mountains, Shat tract, Toganans environs, wet meadow; 49°35'45»N, 82°31'07» E, 634 m above sea level.   |
| 15-18               | <i>D. maculata</i>  | 2018               | Kalbinskiy Altai, eastern part of the Kalbinsky ridge, southwestern periphery of the Koktau mountains, the vicinity of the village Algabas. 49°26'21»N, 82°33'42»E, 696 m above sea level.                             |
| 19-17               | <i>D. umbrosa</i>   | 2017               | Kalbinsky Altai, Kalbinsky ridge, in the region of Sibinsky lakes, before reaching the third upper lake, intermountain valley; the coastal zone of the Sibinka river. 49°22'55»N, 82°38'41» E, 705 m above sea level.  |

The first results of the primary introduction of the genera already make it possible to identify the most promising species for introduction (Table 2).

The species *D. fuchsii* showed a 1.6-fold increase in flowers per inflorescence; increase in the length of the basal leaves by 1.01 times; an increase in the length and width of stem leaves by 1.2 and 1.3 times, respectively (Fig. 3).

During introduction *D. incarnata* species showed an increase in inflorescence length by 1.14 times; increase in flowers in the inflorescence by 1.5 times; an increase in the length and width of basal leaves by 2 and 1.2 times, respectively (Fig. 4).

*D. maculata* and *D. umbrosa* performed slightly less well. The species *D. maculata* showed an increase in flowers in one inflorescence by 1.8 times and an increase in the width of basal leaves by 1.08 times (Fig. 5).

Individuals of *D. umbrosa* showed 1.7-fold increase in flowers in one inflorescence (Fig. 6).

All *Dactylorhiza* species that were introduced in the Altai Botanical Garden showed a decrease in plant height by an average of 1.52 times and a decrease in inflorescence width by 1.1 times. The species *D. fuchsii*, *D. maculata*, and *D. umbrosa* showed a decrease in inflorescence length by an average of 1.7 times. The species *D. maculata* and *D. umbrosa* showed a decrease in the length of basal leaves by an average of 1.4 times. In the case of species *D. umbrosa* and *D. fuchsii*, we noted a decrease in the width of basal leaves by an average of 1.9 times. In almost all species except *D. fuchsii*, was noted a decrease in the length and width of stem leaves by 1.2 and 1.5 times, respectively (Figure 7).

**Table 2** – Measurements of plants of *Dactylorhiza* species

| name of the trait            | <i>D. fuchsii</i>                   |  | <i>D. incarnata</i>                    |                                      | <i>D. maculata</i>                     |                                      | <i>D. umbrosa</i>                       |                                      |
|------------------------------|-------------------------------------|--|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
|                              | In nature, cm                       | In culture, cm                         | In nature, cm                          | In culture, cm                       | In nature, cm                          | In culture, cm                       | In nature, cm                           | In culture, cm                       |
| Plant height                 | $\frac{35-63}{\bar{X}=50,1\pm 3,4}$ | $\frac{30-47}{\bar{X}=36\pm 1,9}$      | $\frac{42-60}{\bar{X}=53,7\pm 3,51}$   | $\frac{25-41}{\bar{X}=36\pm 3,6}$    | $\frac{40-48}{\bar{X}=42,5\pm 2,2}$    | $\frac{28-36}{\bar{X}=32\pm 2,1}$    | $\frac{55-64}{\bar{X}=60\pm 2}$         | $\frac{30-47}{\bar{X}=39,6\pm 3,2}$  |
| Inflorescence length         | $\frac{6-13}{\bar{X}=9,53\pm 0,99}$ | $\frac{5,5-9}{\bar{X}=6,8\pm 0,8}$     | $\frac{4-8}{\bar{X}=6,15\pm 0,44}$     | $\frac{6,5-7,5}{\bar{X}=7\pm 1,65}$  | $\frac{6-10}{\bar{X}=7,2\pm 1,48}$     | $\frac{4-4,5}{\bar{X}=4,25\pm 0,1}$  | $\frac{13-16}{\bar{X}=14,5\pm 1,3}$     | $\frac{6-9}{\bar{X}=7,2\pm 1,4}$     |
| Inflorescence width          | $\frac{2-3}{\bar{X}=2,8\pm 0,2}$    | $\frac{2-3,5}{\bar{X}=2,66\pm 0,4}$    | $\frac{2,5-3,5}{\bar{X}=2,94\pm 0,23}$ | $\frac{2,5-3}{\bar{X}=2,8\pm 0,48}$  | $\frac{2,5-3}{\bar{X}=2,83\pm 0,25}$   | $\frac{2,5-3}{\bar{X}=2,74\pm 0,8}$  | $\frac{4-5}{\bar{X}=4,5\pm 0,22}$       | $\frac{3,5-4}{\bar{X}=3,83\pm 0,17}$ |
| Flowers on one inflorescence | $\frac{14-30}{\bar{X}=29,2\pm 0,5}$ | $\frac{30-46}{\bar{X}=36\pm 2}$        | $\frac{12-49}{\bar{X}=24,3\pm 8,6}$    | $\frac{36-42}{\bar{X}=37\pm 4}$      | $\frac{14-22}{\bar{X}=18,3\pm 2,86}$   | $\frac{30-36}{\bar{X}=33\pm 2,1}$    | $\frac{26-36}{\bar{X}=31\pm 3,4}$       | $\frac{46-64}{\bar{X}=52\pm 3,6}$    |
| Basal leaf length            | $\frac{7-12}{\bar{X}=8,75\pm 1,83}$ | $\frac{7,5-11}{\bar{X}=8,87\pm 1,39}$  | $\frac{5-9}{\bar{X}=6,3\pm 1,4}$       | $\frac{11-15}{\bar{X}=13,1\pm 2,54}$ | $\frac{9-11}{\bar{X}=9,87\pm 1,18}$    | $\frac{6,5-8}{\bar{X}=7,25\pm 0,6}$  | $\frac{13-18}{\bar{X}=15\pm 1,5}$       | $\frac{8-15}{\bar{X}=11\pm 1,9}$     |
| Basal leaf width             | $\frac{2-4}{\bar{X}=3\pm 0,63}$     | $\frac{1,2-1,5}{\bar{X}=1,42\pm 0,07}$ | $\frac{2-2,5}{\bar{X}=2,2\pm 0,25}$    | $\frac{2-3}{\bar{X}=2,7\pm 0,34}$    | $\frac{2-2,5}{\bar{X}=2,12\pm 0,3}$    | $\frac{2-3}{\bar{X}=2,3\pm 0,12}$    | $\frac{4,6-7}{\bar{X}=5\pm 0,3}$        | $\frac{3-3,5}{\bar{X}=3,2\pm 0,15}$  |
| Length of stem leaves        | $\frac{6-10}{\bar{X}=9,2\pm 0,8}$   | $\frac{8-10}{\bar{X}=9,2\pm 1,58}$     | $\frac{7-11}{\bar{X}=9,75\pm 2,63}$    | $\frac{6-10}{\bar{X}=8,5\pm 1,86}$   | $\frac{11-16}{\bar{X}=13,3\pm 1,86}$   | $\frac{8-10}{\bar{X}=9,3\pm 0,2}$    | $\frac{19-20}{\bar{X}=19,5\pm 0,18}$    | $\frac{11-25}{\bar{X}=16,2\pm 2,4}$  |
| Stem leaf width              | $\frac{1-1,5}{\bar{X}=1,3\pm 0,18}$ | $\frac{1-2}{\bar{X}=1,6\pm 0,17}$      | $\frac{2-2,5}{\bar{X}=2,2\pm 0,14}$    | $\frac{1-1,5}{\bar{X}=1,33\pm 0,21}$ | $\frac{1,5-2,5}{\bar{X}=1,83\pm 0,41}$ | $\frac{0,7-2}{\bar{X}=1,24\pm 0,08}$ | $\frac{0,78-2,56}{\bar{X}=1,3\pm 0,34}$ | $\frac{1-2}{\bar{X}=1,6\pm 0,14}$    |

In the numerator min-max – the minimum and maximum value of the indicator; the denominator is the average value of the indicator

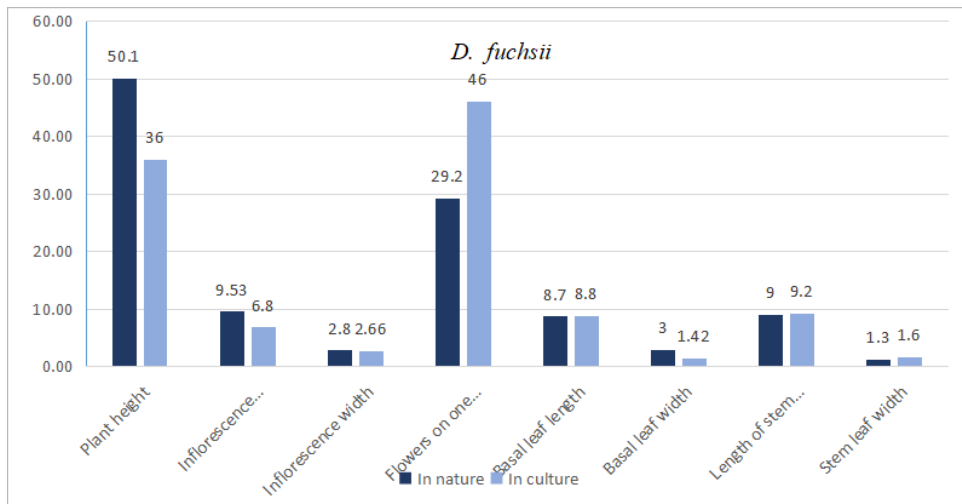


Figure 3 – Indicators of *D. fuchsii* in nature and during introduction

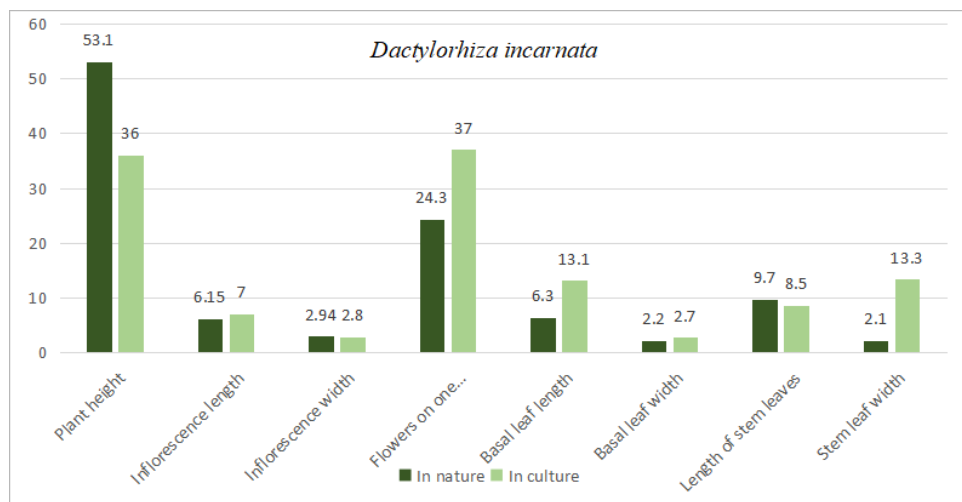


Figure 4 – Indicators of *Dactylorhiza incarnata* in nature and during introduction.

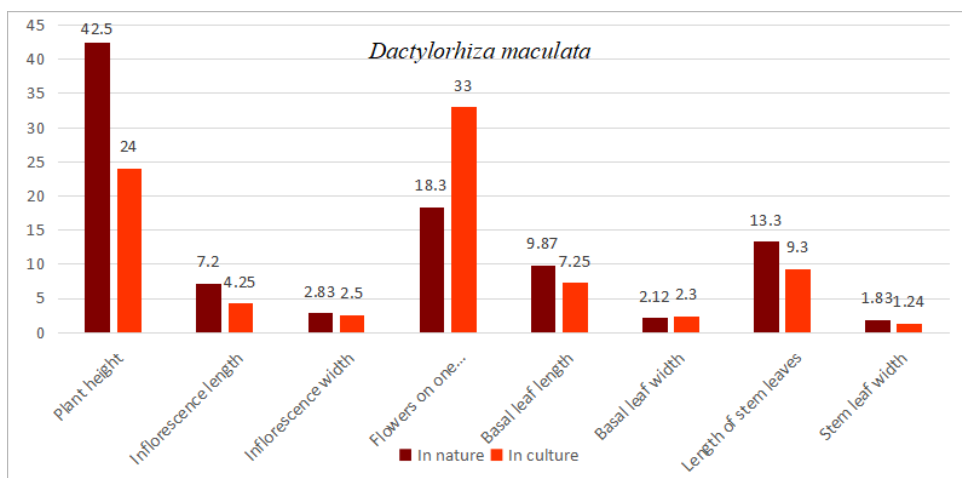


Figure 5 – Indicators of *Dactylorhiza maculata* in nature and during introduction.

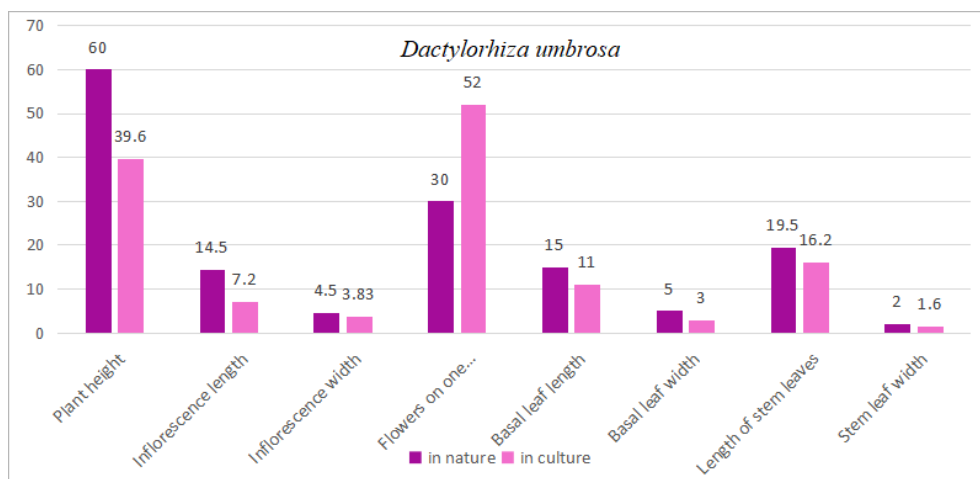


Figure 6 – Indicators of *Dactylorhiza umbrosa* in nature and during introduction

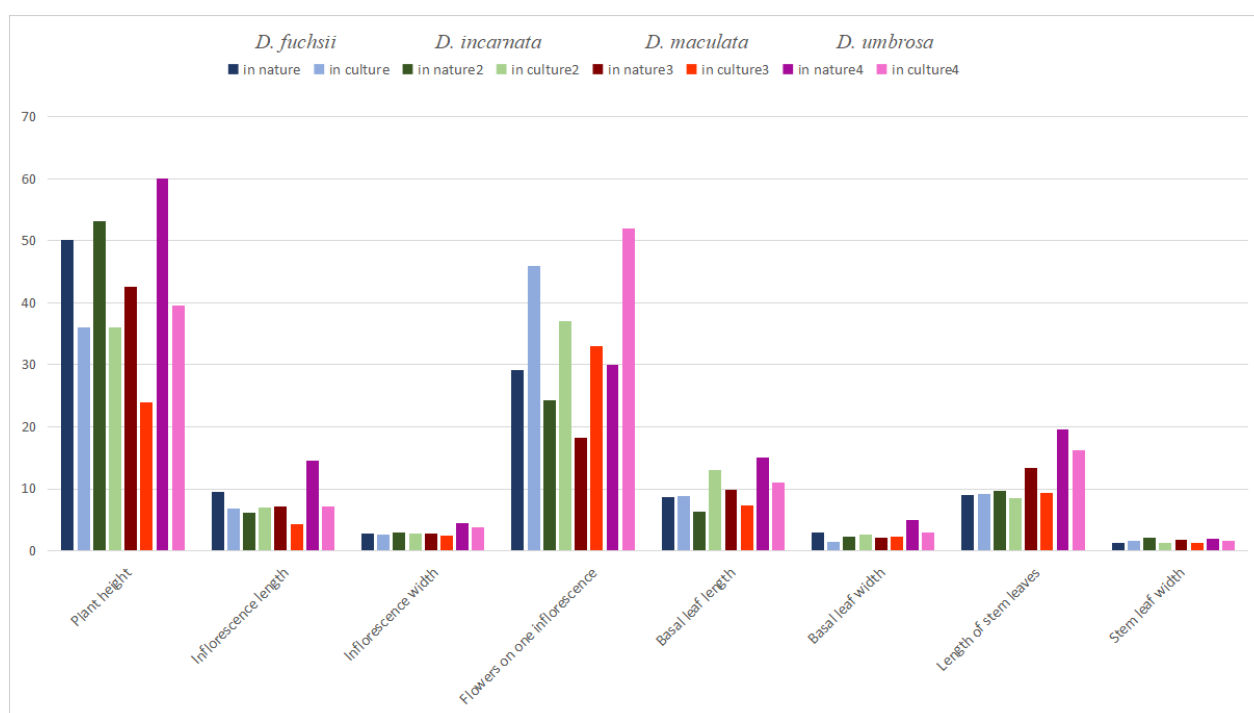


Figure 7 – Comparison of indicators of all *Dactylorhiza* species

The main limiting factors for the dispersal of the species in natural habitats are high competition in phytocenoses, anthropogenic load, and strict ecological confinement. During introduction, the limiting factors are strong insolation, dry air, soil poverty and insufficient acidity.

For *D. fuchsii* and *D. maculata* species, direct sunlight and dry air is destructive. In nature, these species grow in thickets where the air is humid and direct sunlight does not enter. Due to the periodic weeding of the area *Dactylorhiza* species will decrease in height due to the abundance of sunlight.

In nature, all soils are poor in nutrients. During introduction, the plants were planted in soils enriched with nutrients and minerals. This gave an impetus to increase the number of flowers per inflorescence, fruiting and productivity. The overall indicators are also decreasing due to dry air and insufficient irrigation. In the future, watering of this area will be intensified. A decrease of indicators *D. maculata*, *D. umbrosa*, and *D. incarnata* were noted due to insufficiently acidic soil. It is important to take into account the species plasticity. The species *D. incarnata* adapts well to the cultivation conditions.



Based on the obtained data, can be drawn the following conclusions:

1. Individuals of the species *D. incarnata* are plastic and adapt well to the culture conditions; they showed the best results in terms of introduction. Inflorescence length indicators increased by 14%, and the number of flowers per inflorescence by 52%. The length and width of basal leaves increased by 108% and 23%, respectively.

2. Individuals *D. umbrosa* showed poor results. Almost all morphometric parameters were reduced. An increase of 73% was only seen in the number of flowers per inflorescence. The rest of the indicators were reduced by an average of 29%.

3. The species *D. fuchsii* showed an increase in flowers per inflorescence by 57%; indicators of the length of basal leaves and the length of stem leaves remained almost unchanged, and the width of stem leaves increased by 23%.

4. Some indicators of *D. maculata* species have decreased significantly. The height of the plant decreased by 43%, the length of the inflorescence by 41%, the length of the basal leaves by 27% and the length of the stem leaves by 30%. And the number of flowers per inflorescence has increased by 80%. The width of the basal leaves increased slightly by 8%.

## Conclusion

Primary introduction of species of the genera *Dactylorhiza* in the Altai Botanical Garden resulted as stable collection of 4 species of the genera *Dactylorhiza*: *D. fuchsii*, *D. incarnata*, *D. maculata* and *D. umbrosa*. The species *D. incarnata* proved

to be more plastic and adaptable to the cultivation conditions, the indicators of the length of the inflorescence, the number of flowers per inflorescence, the length and width of the basal leaves increased significantly. *D. umbrosa* reduced all parameters except the number of flowers per inflorescence. Due to the high nutritional content of the soil, the number of flowers per inflorescence increased in all 4 species. In addition, the indicator of plant height, due to the receipt of more sunlight decreased in all species.

The results of the study have of great importance for the development of introduction agricultural technology of rare and endangered plants in the mountain-taiga zone of East Kazakhstan, contribute to the preservation of biodiversity.

Due to the short-term observation, more detailed analyzes of the results will be obtained with the further continuation of the introduction experiment.

## Conflict of interests

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

## Source of financing

The article was prepared with the financial support of Science Technical Program “Development of scientific and practical foundations and innovative approaches to plant introduction in natural zones of Western and Eastern Kazakhstan for rational and effective use” of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan for 2021-2022.

## References

- 1 Semenova G.P. Rare and Endangered Species of Siberian Flora: Biology and Conservation. Novosibirsk: Academic publishing house “Geo”, 2007. 406 p.
- 2 Akeroyd J., Wyse Jackson P. (eds). A handbook for Botanic Gardens for Reintroduction of Plants to the Wild. BGCI, 1995.
- 3 Baskin J.M., Baskin C.C., Li X. Taxonomy, ecology, and evolution of physical dormancy in seeds // *Plant Species Biology*. 2000. No 15. P. 139–152.
- 4 Trusty J.L., Miller I., Pence V., Clair B.L., Boyd R.S., Goertzen L.R. *Ex situ* conservation of the federally endangered plant species *Clematis socialis* Kral (Ranunculaceae) // *Nat. Areas J.* 2009. Vol. 29. P. 500–508.
- 5 Choudhury B., Khan M.L. Conservation and Management of Endangered Plant Species: a case study from Northeast India // *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*. 2010. Vol. 4, No 1. P. 47–53.
- 6 Jusaitis M., Polomka L., Sorensen B. Habitat specificity, seed germination and experimental translocation of the endangered herb *Brachycome muelleri* (Asteraceae) // *Biological Conservation*. 2004. II 6: 25. 266 c.
- 7 De Pauw M.A., Remphrey W.R., Palmer C.E. (1995). The cytokinin preference for *in-vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Ann. Bot.* 75:267-275.
- 8 Arditti J., Clements M.A., Fast G., Hadley G., Nishimura G., Ernst R. (1982). Orchid seed germination and seedling culture. In: Arditti J (ed.). *A manual in Orchid Biology – Reviews and Perspectives*. Cornell University Press, Ithaca, New York. Vol. II, p. 243.
- 9 Rasmussen H.N. (1992). Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. *Physiol. Plant* 86:161-167.

- 10 Zettler L.W., Stewart S.L., Bowles M.L., Jacobs K.A. (2001). Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *Am. Midland Nat.* 145:168-175.
- 11 Stoutamire W.P. (1974). Terrestrial orchid seedlings. In: Withner CL (ed.). *The Orchids – Scientific Studies*. Wiley Interscience, New York. pp. 101-128.
- 12 Vij S.P., Srivastav R.C., Mainra A.K. (1992). On the occurrence of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo in Sikkim, Orch. News pp. 8-9; 14-15.
- 13 Kalimuthu K., Senthilikumar R., Vijayakumar S. (2007). *In vitro* micropropagation of orchid, *Oncidium* sp., Afr. J. Biotechnol. 6 (10):1171-1174.
- 14 Aggarwal, S., & Zettler, L.W. (2010). Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, assisted by symbiotic seed germination: First report from the Indian subcontinent. *Nature and Science*, 8(10), 139-145.
- 15 Sidorov, A.V., Sechin, E.N., & Marakaev, O.A. (2014). Effect of light on the growth and development of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) seedlings in vitro culture. *Bulletin of the Nizhny Novgorod University. NI Lobachevsky*, (3-3).
- 16 Ellstrand, N.C. and Elam, D.R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217–242.
- 17 Ottewell, K.M. et al. 2015. Bridging the gap: a genetic assessment framework for population-level threatened plant conservation prioritization and decision-making. – *Divers. Distrib.* 22: 174–188.
- 18 Dzybov D.S. Fundamentals of biological reclamation of disturbed lands. Stavropol, 1995. 60 p.
- 19 Shumikhin S.A. Stages of introduction of rare and endangered plant species // *Problems of the Red Data Books of Russian Regions: Materials of interregion. scientific-practical conf.* (November 30 – December 1, 2006, Perm). Perm: Perm. un-t., 2006. 196-198.
- 20 Rasteniia prirodnoi flory v Glavnom botanicheskom sadu im. N. V. Tsitsina Rossiiskoi akademii nauk: 65 let introduktsii. – M.: T-vo nauchnykh izdaniy KMK, 2013. 118-119.
- 21 Kashani, H.H., Faraji, Z., Nikzad, H., Parivar, K., & Nikzad, M. (2012). The effect of aqueous extract of Salep prepared from root-tubers of *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae) on the testes and sexual hormones of immature male mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(24), 4102-4106.
- 22 Choukaryia, R., Choursia, A., & Rathi, J. (2019). In Vivo and In Vitro Antidiabetic Activity of Hydroalcoholic Extract of *Dactylorhiza hatagirea* Roots: An Evaluation of Possible Phytoconstituents. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(6-s), 76-81.
- 23 Ranpal, S. (2009). An assessment of status and antibacterial properties of *Dactylorhiza hatagirea* in Annapurna conservation area (A case study of Papekharka, Lete VDC, Mustang). *I Tribhuvan University Institute of Forestry*, 3.
- 24 Sobolevskaya K.A. Endangered Siberian Plants in the introduction. Novosibirsk: Nauka, 1984. – 222 p.
- 25 Methods of phenological observations in botanical gardens // *Bul. GBS of the USSR Academy of Sciences*, 1979. – Issue. 113. – 3-8.
- 26 Guidelines for the registration of collection plants of botanical gardens of the USSR. – M., 1978. – 37 p.
- 27 Rabotnov T.A. To the method of observation of herbaceous plants on permanent sites // *Bot. zhurn.* – 1951. – Vol. 36.No. 6. 643-645.
- 28 Golubev V.N., Molchanov E.F. Methodical instructions for population-quantitative and ecological-biological study of rare, endangered and endemic plants of Crimea. – Yalta, 1978. – 41 p.
- 29 Denisova L. V., Nikitina S. V., Zaugolnaya L.B. Program and methodology for observing cenopopulations of plant species in the Red Data Book of the USSR. – Moscow: Gosagroprom of the USSR, All-Russian Research Institute for the Protection of Natural and Reserve Business, 1986. – 98 p.
- 30 Vakhrameeva M.G., Varlygina T.I., Tatarenko I.V. Orchids of Russia (biology, ecology and conservation). M., 2014. – 474 p.
- 31 Kotukhov Yu.A., Danilova A.N., Anufrieva O.A. The current state of populations of rare and endangered plants in East Kazakhstan. Almaty: 2006.177 p.
- 32 Sokolov A.A. General features of soil formation and soils in East Kazakhstan. – Alma-Ata: Nauka, 1972. – 107 p.
- 33 Buswell J.M., Moles A.T., and Hartley S. Is rapid evolution common in introduced plant species? // *Journal of Ecology*. – 2011. – 99. – P. 214 – 224.



IRSTI 34.29.01; 34.29.25; 68.47.94

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v87.i2.07>

L. Shadmanova<sup>1\*</sup> , G. Mukanova<sup>1</sup> , S. Murzahmetov<sup>1</sup> ,  
A. Alpysbayeva<sup>1</sup> , A. Sankaibaeva<sup>1</sup> , S. Yerekeyeva<sup>2</sup> , B. Kaliyev<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>RSE «Institute of botany and phytointroduction» CFW MEGNR RK, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Kazakh National Agrarian Research University, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>Kazakh National Women's Teacher Training University, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: laura\_shadmanova@mail.ru

## INTRODUCTION AND COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF *MALUS SIEVERSII* VARIETY CLONES OF THE DZHUNGARIAN POPULATION

*Malus sieversii* is a mountain-steppe and valley tree species widespread in the mountains of south-east Kazakhstan. The aim of this work is to study the structure of variability and intraspecific differentiation of *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. based on a complex of morphological features of generative organs and the characteristics of the seasonal rhythm of apple trees in natural and introduction conditions. *Malus sieversii* is a mountain-steppe and valley tree species widespread in the mountains of southeast Kazakhstan. The introduction collection of *Malus sieversii*'s forms growing in the Main Botanical Garden of Almaty (GBS) is a source of global genetic resources. According to the research data, the intraspecific variability of the studied apple tree forms was characterized by heterogeneous morphometric parameters of the generative organs. The studied apple trees are distinguished by heterogeneous morphometric parameters. Large-flowered forms were observed both in natural populations and in GBS. In the conditions of the Dzungarian Alatau, the large sizes of flowers were characteristic of the forms in the gorges of Pikhtovaya and Mushabay. Among the variety clones the sample TP-19 selected in the Pikhtovaya distinguished itself by the large size of the corollas.

**Kew words:** flowering of the apple tree, flowering period, generative organs, *Malus sieversii* forms.

Л.Ш. Шадманова<sup>1\*</sup>, Г.С. Муканова<sup>1</sup>, С.Н. Мурзахметов<sup>1</sup>,  
А.Б. Алпысбаева<sup>1</sup>, А.Г. Санкайбаева<sup>1</sup>, С.Ж. Ерекеева<sup>2</sup>, Б.Ш. Калиев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>РМК «Ботаника және фитоинтродукция институты» ҚР ЭГТРМ ОШЖДҚ, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: laura\_shadmanova@mail.ru

### Жоңғар популяциясының Сиверс алмасының сорт-клондарының жерсіндірілген және салыстырмалы сипаттамасы

Сиверс алма ағашы – Қазақстанның оңтүстік-шығысындағы тауларда кең таралған ағаштың таулы-дала және алқаптық түрі. Жабайы алма ормандарының табиғи (in-situ) ареалдарының тозуы, сондай-ақ табиғи популяцияларының қайта қалпына келуінің төмен болуы жағдайында Сиверс алмасының жерсіндірілген коллекциясы әлемдік маңызы бар генетикалық ресурстардың көзі болып табылады. Бұл жұмыстың мақсаты – табиғи және интродукция жағдайында *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem түрінің өзгергіштік құрылымын және түршілік дифференциациясын алманың генеративті мүшелерінің морфологиялық ерекшеліктері мен маусымдық ырғағы негізінде зерттеу. Сиверс алма ағашы (*Malus Sieversii* (Ledeb.) Roem.) – Қазақстанның оңтүстік-шығыс тауларында кең таралған таулы-дала белдеуінде және алқаптарда өсетін ағаштар. Алматы қаласының Бас Ботаникалық бағындағы Сиверс алмасының жерсіндірілген коллекциясы әлемдік генетикалық ресурстардың көзі болып табылады. Зерттеу нәтижесі бойынша зерттелген алма ағашы формаларының түршілік өзгергіштігі генеративті мүшелердің гетерогенді морфометриялық параметрлерімен ерекшеленді. Ірі гүлді формалар табиғи популяцияларда да, GBS-де де байқалды. Жоңғар Алатауы жағдайында Пихтовая және Мушай шатқалдарындағы формаларға үлкен гүл өлшемдері тән болды. Жерсіндірілген коллекцияда Пихтовая шатқалынан іріктелген ТП-19 сорт-клонының күлте жапырақтары үлкен өлшемдерімен ерекшеленді.

**Түйін сөздер:** *Malus sieversii* формалары, генеративті мүшелері, гүлдеу кезеңі, алманың гүлдері, сорт-клон.

Л.Ш. Шадманова<sup>1\*</sup>, Г.С. Муканова<sup>1</sup>, С.Н. Мурзахметов<sup>1</sup>,  
А.Б. Алпысбаева<sup>1</sup>, А.Г. Санкайбаева<sup>1</sup>, С.Ж. Ерекеева<sup>2</sup>, Б.Ш. Калиев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup>Казахский национальный женский педагогический университет, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: laura\_shadmanova@mail.ru

### Интродукционная и сравнительная характеристика сорт-клонов яблони Сиверса джунгарской популяции

Яблоня Сиверса – горно-степной и долинный вид дерева, широко распространенный в горах юго-востока Казахстана. В условиях деградирования естественных ареалов (*in-situ*) диких яблоневых лесов, а также низкого возобновления в природе, интродукционная коллекция яблони Сиверса является источником генетических ресурсов, имеющих мировое значение. Цель данной работы – изучение структуры изменчивости и внутривидовой дифференциации *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. на основе комплекса морфологических признаков генеративных органов и особенностей сезонной ритмики деревьев яблони в природных и интродукционных условиях. Яблоня Сиверса (*Malus Sieversii* (Ledeb.) Roem.) – горно-степной и долинный вид дерева, широко распространенный в горах юго-востока Казахстана. Интродукционная коллекция форм яблони Сиверса, произрастающей в главном ботаническом саду г. Алматы, является источником генетических ресурсов, имеющих мировое значение. Согласно данным исследования, внутривидовая изменчивость изученных форм яблони характеризовалась неоднородными морфометрическими показателями генеративных органов. Крупноцветковые формы наблюдались как в природных популяциях, так и в ГБС. В условиях Джунгарского Алатау крупные размеры цветков были свойственны формам в ущельях Пихтовая и Мушабай. Из сорт-клонов отличился крупными размерами венчиков ТП-19, отобранный в Пихтовой.

**Ключевые слова:** формы *Malus sieversii*, генеративные органы, период цветения, цветки яблони, сорт-клон.

## Introduction

There are several traditional ways to preserve phytocenotic diversity: – protecting the species and populations in natural conditions by growing them in reserves and national parks; – conservation in cultural conditions by perfecting the propagation methods, creating the introductive populations as well as widespread introduction into landscaping or production. An important direction of preservation of general phyto-diversity, rare and economically valuable plant species is their artificial reservation by cultivation in botanical gardens [1; 2].

In Almaty in the Main botanical garden (MBG) as well as in the laboratory for the protection of the gene pool and the introduction of wild fruit plants named after A. Dzhangaliyev has got a collection of wild fruit plants of Kazakhstan (more than 1000 specimens) including the unique *Malus sieversii* gene pool [3].

*Malus sieversii* is a mountain-steppe and valley tree species widespread in the mountains of south-east Kazakhstan. In natural conditions it is a large tree up to 14 m high with a wide spreading crown. Flowers are in umbrella-shaped inflorescences by 3-7, pinkish or pink, 5-11 cm in diameter; a calyx is grey and pubescent; hypanthia and pedicels are thick and pubescent [4; 5]. *Malus sieversii* blossoms

in the middle of May and bears fruit in August-September.

A unique (*ex-situ*) introductive collection created by Academician A. Dzhangaliyev gave rise to the gene pool preservation of wild *Malus sieversii* in cultivated conditions and the allocation of promising forms for various practical purposes according to the results of introduction [6].

In conditions of degradation of natural habitats (*in-situ*) of wild apple forests, as well as their low regeneration in nature, the collection *Malus sieversii* is a source of genetic resources of global importance [7-13].

The study of wild-fruit apple tree includes the followings: – expeditionary and introductive surveys with the selection of the most valuable wild forms and their subsequent placement in collections in the territory of the MBG; – identification of some laws of their development; – determination of morphological parameters of flowering of individual trees and the most valuable forms of apple trees by ecological and morphological features. Agrotechnical measures in the introduction garden satisfy to requirements and recommendations of agrotechnical care for gardens [14-16].

The purpose of this work is to study the structure of variability and intraspecific differentiation of *Malus sieversii* based on a complex of morphologi-

cal features of generative organs and features of seasonal rhythm of the trees in natural and introductive conditions.

### Objects and methods of investigation

The objects of our research are new apple variety-clones of the Dzungarian population (variety clones TM-1, TM-2, TM-5, TM-7, TM-8, TM-9 were selected in the Mushabay gorge; variety-clones

TP-19 – TP-25 were selected in the Pikhtovoye gorge) and forms currently growing in the gorges Pikhtovaya (FP), Mushabay (FM) and Krutoye (FK) of the Dzungarian Alatau.

The studied plants have been of artificial (variety clones) and natural origin (seed, shootings). The location of the trees in natural populations has been marked by a GPS navigator (Table 1). Phenological phases of development and morphological features of generative organs were also investigated.

**Table 1** – Characteristics of the sampling site of *Malus sieversii*

| Populations   | Location   | Altitude of explored location, m above the sea level | Geographical coordinates                                  |
|---|--|--|---|
| Introduction collection MBG   | The Main Botanical Garden of Almaty  | 877-892  | N43°13'12"<br>E76°54'54"                                  |
| Forms of a wild apple tree in the Pikhtovaya gorge, Dzhungarskiy Alatau | Along the Mushabay water divide on the left bank of the river of Terekty         | 1124-1140  | N45°24'01.3" E80°23'17.0"–<br>N45°24'13.4" E80°23'46.9"   |
| Forms of a wild apple tree in the Mushabay gorge, Dzungar Alatau        | Along the Mushabay water divide between the rivers of Soldatskaya and Pikhtovaya | 1131-1149  | N45°23'56.0" E80°23'14.1"–<br>45°24'47.9"<br>E80°23'13.0" |
| Forms of a wild apple tree in the Mushabay gorge, Dzungar Alatau        | South of the Zhunzhurek settlement on the right bank of the Lepsa river          | 1488-1512  | N45°33'21.8" E80°43'48.5"–<br>N45°33'22.4" E80°44'02.4"   |

Conventional techniques were used during the research implementation [17; 18; 19]. Statistics data were calculated for each parameter [20; 21]. Mathematical analysis of the results was carried out using Microsoft Excel software.

Collection of morphometric characteristics of the features of each sample was carried out in the field conditions using a vernier caliper with an accuracy of 1 mm during the 2017-2019 period.

### Results and discussion

Depending on the research conditions the date of the developmental phases and their duration differed for different forms of *Malus sieversii*.

While early spring the vegetation can begin in the middle of March; while late spring it can start in the middle of April. So, during the years of research, the beginning of vegetation in most forms under MBG conditions was noted at the end of March when the daytime air temperature rose above + 12°C. Under *in-situ* conditions, it usually started at the end of April, in some years at the first decade of May.

Generative buds in apple tree start blooming simultaneously with vegetative ones.

Apple flowering in the botanical garden begins in early April, in some years at the end of the month. The earliest is the variety clone TP-23, the latest are the variety-clones TM-1 and TM-9. The duration of the period from budding to flowering is 10-12 days. Flowering lasts an average of 7-10 days depending on air temperature. With temperature increasing the flowering period decreases.

For comparative analysis the phenophases of *Malus sieversii* forms under natural conditions were also studied. So, it was noted the later flowering of the apple tree in the gorges of the Dzungarian Alatau.

*Malus sieversii* flowering in natural conditions began in early May, in the southern expositions and in the expositions with a sufficient level of solar insolation; at the end of the first decade of May it started in the northern expositions.

As the height of the tree growth site increases, flowering began for 2 days later per every 100 m above the sea level.

According to data of A.D. Dzhangaliyev, the temperature of the environment is one of the main factors affecting the dates of beginning and duration of inter phases periods of the apple tree [5]. The vegetation period of *Malus sieversii* in natural conditions is shorter than the vegetation period of trees growing in MBG. It can be explained by the adaptation of plants to mountain environmental conditions.

Generative organs of woody plant species, as it is known, are less dependent on environmental factors [22; 23]. The flower is less subjected to environmental changes compared to vegetative organs of the plant. During the flowering period, the apple tree has the most decorative qualities, which are formed from the features of the flower structure [24; 25].

Morphometric characteristics of the flowers of variety clones in the collection plot and selective forms of wild apple trees in natural conditions are presented in Table 2.

The mean arithmetic (M) and its error were determined, as well as the coefficient of variation (CV, %) was also determined. Almost all the studied parameters of the flowers varied.

According to Table 2, intraspecific variability of studied apple forms was characterized by heterogeneous morphometric indices of generative organs.

The coefficient of variation of the corolla values of flowers in different forms ranged from 10 to 20%; the values of the diameter of the flowers and the length of the petals varied within the "upper" norm (39 and 19%); the length of the pestles and stamens of the flowers varied within the "lower" norm (8 and 10%, respectively).

Note: these tables contain data of the forms of the Dzungarian population selected according to their economically valuable features for replenishment and fixation in the introduction collection.

In the natural population, the forms differed from the variety clones in the MBG collection by large flowers. Large-flowered forms were observed in the Pikhtovaya population. The maximum diameter of the flowering corollas was noted in the forms FP-15 and FP-16. Among the variety clones the TM-19 sample selected in the Mushabay gorge distinguished itself by the large sizes of the corollas. Also, the large sizes of the flowers were characteristic of natural forms in the gorge Mushabay. (FM-20, FM-21).

Under GBG conditions, the maximum diameter of the corollas was observed in the variety clone TM-9 (max 50.11 mm) selected in the Mushabay gorge.

The minimum flower size was noted in variety clones TP-22 and TM-7 (22.7 mm and 24.3 mm, respectively). The average width of the corollas of flowers in variety clones of *Malus sieversii* was  $11.83 \pm 0.5$  mm, while the width of the corolla petals from natural populations was on average  $14.72 \pm 0.58$ .

The maximum length of the stamens was noted in the forms FK-28 and FP-14 (20.4 and 9.8 mm), under MBG conditions these were variety clones TM-1 and TM-8 (9.8 and 9.7 mm); the minimum values were in the forms FP-16, FK-25 (7.2 and 7.4 mm) from the gorges Pikhtovoye and Krutoye and the variety clones TP-20 and TP-24 (7.2 mm each) from the MBG.

The maximum pestle length was noted in the forms FK-28 and FK-24 (16.4 and 12.6 mm) from the Krutoye gorge and in the variety clones TM-9, TM-1 (10.4 and 10.2 mm) selected in the Mushabay gorge; minimum dimensions were in the forms FM-23 and FP-15 (6.9 and 7.6 mm) from the Mushabay and the Pikhtovoye gorges, and the variety clone TP-25 (7.5 mm) under MBG.

The values of the calculated average values by the diameter of the corolla were closest to the form FK-24 and variety clone TM-1; by the length of the petal – to the form FK-27 and variety clone TM-1; by the width of the petal – to the form FP-15 and variety clone TM-7; by the length of the stamens – to the form FM-23 and variety clone TM-7; by the length of the pestle – to the form FM-20 and variety clone TP-21.

It can be noted that the observed diversity of the morphological parameters of flowers suggests the seed origin of the trees in the studied population (or populations) of the Mushabay and the Pikhtovoye; while in the gorge Krutoye the flowers of apple inflorescences were smaller and had a lower level of variability due to a significant altitude above sea level, indicating that vegetative (shootings) reproduction prevailed in this population.

Observations of the flowering of variety clones in MBG and the forms in the natural population showed that flowers also varied in quality (corolla color, margins and type of petal attachment) (Table 3). Analysis of the table 3 demonstrated that in the gorges of Pikhtovoye and Mushabay the corollas of flowers of the researched forms were painted in white and pink colour.

The materials reviewed indicated that in the gorge Pikhtovoye of the Dzungarian Alatau flowers are large and the forms of apple trees in flowering are more decorative.

Table 2 – Morphometric characteristics of the flowers of the Sievers apple tree

| №  | Clone variety,<br>apple tree forms | Average<br>diameter of the<br>corollas, mm | C <sub>v</sub> , % | Average length<br>of the petal, mm | C <sub>v</sub> , % | average width of<br>the petal, mm | C <sub>v</sub> , % | Average length<br>of the pestles,<br>mm | Average length<br>of the stamens,<br>mm |
|--|------------------------------------|--|--------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------|---|---|
| 1  | 2                                  | 3  | 4                  | 5                                  | 6                  | 7                                 | 8                  | 9                                       | 10                                      |
| <b>Introduction collection MBG, Almaty</b> |                                    |  |                    |                                    |                    |                                   |                    |   |   |
| 1.   | TM-1                               | 32,0±0,16                                  | 1,16               | 16,9±0,23                          | 2,6                | 11,1±0,23                         | 2,58               | 9,8±0,1                                 | 10,2±0,20                               |
| 2.   | TM-2                               | 39,4±0,19                                  | 1,16               | 17,5±0,72                          | 3,96               | 13,3±0,67                         | 2,19               | 7,6±0,21                                | 7,60±0,18                               |
| 3.   | TM-5                               | 24,9±0,09                                  | 0,92               | 13,0±0,33                          | 1,8                | 12,1±0,26                         | 2,55               | 7,6±0,21                                | 7,97±0,25                               |
| 4.   | TM-7                               | 24,3±0,20                                  | 1,98               | 12,2±0,35                          | 2,55               | 12,1±0,35                         | 2,62               | 7,4±0,15                                | 7,60±0,17                               |
| 5.   | TM-8                               | 26,0±0,33                                  | 3,14               | 14,0±0,7                           | 3,07               | 9,8±0,34                          | 2,65               | 9,7±0,14                                | 9,2±0,24                                |
| 6.   | TM-9                               | 50,11±0,62                                 | 3,06               | 25,01±0,19                         | 1,20               | 16,2±0,84                         | 4,30               | 9,7±0,14                                | 10,4±0,14                               |
| 7.   | TII-19                             | 41,0±0,58                                  | 3,45               | 22,2±0,31                          | 1,85               | 14,2±0,09                         | 3,50               | 9,00±0,24                               | 9,6±0,15                                |
| 8.   | TII-20                             | 37,3±0,71                                  | 4,68               | 16,3±0,26                          | 3,08               | 11,4±0,30                         | 2,67               | 7,2±0,24                                | 7,60±0,15                               |
| 9.   | TII-21                             | 39,0±0,77                                  | 4,01               | 18,1±0,19                          | 1,45               | 15,3±0,4                          | 3,00               | 8,8±0,19                                | 8,60±0,17                               |
| 10.  | TII-22                             | 22,7±0,26                                  | 3,08               | 11,1±0,17                          | 2,02               | 9,2±0,23                          | 2,58               | 7,6±0,21                                | 7,60±0,15                               |
| 11.  | TII-23                             | 38,3±0,37                                  | 2,59               | 19,0±0,2                           | 2,9                | 10,9±0,18                         | 2,50               | 8,8±0,19                                | 9,0±1,15                                |
| 12.  | TII-24                             | 28,14±0,37                                 | 2,57               | 14,02±0,15                         | 2,76               | 13,5±0,8                          | 4,71               | 7,2±0,24                                | 7,60±0,15                               |
| 13.  | TII-25                             | 29,12±0,35                                 | 2,55               | 14,8±0,60                          | 9,6                | 13,8±0,5                          | 3,82               | 7,6±0,21                                | 7,50±0,15                               |
| <b>Average</b>                             |                                    | <b>33,25±2,2</b>                           |                    | <b>16,47±1,06</b>                  |                    | <b>11,83±0,5</b>                  |                    | <b>8,31±0,27</b>                        |   |
| <b>“Mushabay” gorge, Dzungarian Alatau</b> |                                    |  |                    |                                    |                    |                                   |                    |   |   |
| 14.  | ΦM19                               | 43,00±0,3                                  | 1,76               | 21,0±0,29                          | 2,44               | 16,0±0,29                         | 4,72               | 8,8±0,19                                | 11,6±0,21                               |
| 15.  | ΦM20                               | 44,4±0,21                                  | 1,49               | 19,2±0,39                          | 6,51               | 17,7±0,14                         | 4,54               | 9,7±0,14                                | 11,2±0,24                               |
| 16.  | ΦM21                               | 44,6±0,15                                  | 1,10               | 19,3±0,28                          | 4,66               | 18,9±0,26                         | 4,40               | 9,7±0,14                                | 9,6±0,15                                |
| 17.  | ΦM22                               | 42,7±0,38                                  | 2,78               | 15,1±0,59                          | 12,4               | 11,5±0,16                         | 4,35               | 7,4±0,21                                | 10,30±0,3                               |
| 18.  | ΦM23                               | 42,0±0,35                                  | 2,61               | <b>17,4±0,29</b>                   | <b>5,27</b>        | 16,6±0,43                         | 8,17               | 9,2±0,24                                | 6,9±0,22                                |

Continuation of table 2

| No   | Clone variety,<br>apple tree forms | Average<br>diameter of the<br>corollas, MM | C <sub>v</sub> % | Average length<br>of the petal, MM | C <sub>v</sub> % | average width of<br>the petal, MM | C <sub>v</sub> % | Average length<br>of the pestles,<br>MM | Average length<br>of the stamens,<br>MM |
|--|------------------------------------|--|------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|---|---|
| 1  | 2                                  | 3  | 4                | 5                                  | 6                | 7                                 | 8                | 9                                       | 10                                      |
| <b>“Pikhtovaya” gorge, Dzungarian Alatau</b> |                                    |  |                  |                                    |                  |                                   |                  |   |   |
| 19.  | ФП-14                              | 32,0±0,75                                  | 3,98             | 17,6±0,22                          | 2,17             | 12,4±0,22                         | 3,40             | 9,8±0,18                                | 9,80±0,22                               |
| 20.  | ФП-15                              | 44,7±0,23                                  | 1,48             | 21,86±0,24                         | 2,92             | 15,0±0,37                         | 6,66             | 7,6±0,22                                | 7,60±0,22                               |
| 21.  | ФП-16                              | 51,4±0,35                                  | 1,93             | 20,14±0,24                         | 3,17             | 17,0±0,68                         | 12,7             | 7,2±0,24                                | 9,6±0,21                                |
| 22.  | ФП-17                              | 34,6±0,19                                  | 1,11             | 15,12±0,84                         | 11,1             | 12,43±0,2                         | 2,69             | 9,6±0,15                                | 9,5±0,16                                |
| 23.  | ФП-18                              | 30,86±1,0                                  | 6,47             | 14,14±0,6                          | 1,48             | 13,6±0,73                         | 9,79             | 7,6±0,21                                | 10,3±0,25                               |
| <b>“Krutoe” gorge, Dzungarian Alatau</b>     |                                    |  |                  |                                    |                  |                                   |                  |   |   |
| 24.  | ФК24                               | 40,2±0,19                                  | 1,49             | 17,5±0,16                          | 2,86             | 12,5±0,16                         | 4,00             | 9,0±0,24                                | 12,6±0,15                               |
| 25.  | ФК25                               | 34,7±0,14                                  | 1,32             | 17,6±0,15                          | 2,78             | 16,3±0,32                         | 6,17             | 7,4±0,15                                | 7,60±0,15                               |
| 26.  | ФК26                               | 31,0±0,55                                  | 5,59             | 17,8±0,53                          | 9,33             | 11,3±0,28                         | 7,78             | 9,50±0,16                               | 9,50±0,16                               |
| 27.  | ФК27                               | 42,1±0,35                                  | 2,62             | 18,0±0,60                          | 10,1             | 12,2±0,18                         | 3,80             | 8,6±0,2                                 | 8,80±0,15                               |
| 28.  | ФК28                               | 35,3±0,20                                  | 1,81             | 20,4±0,15                          | 2,40             | 16,5±0,16                         | 3,03             | 20,4±0,15                               | 16,4±0,15                               |
| 29.  | ФК29                               | 34,7±0,14                                  | 1,32             | 17,6±0,15                          | 2,78             | 16,3±0,32                         | 6,17             | 7,40±0,15                               | 7,60±0,15                               |
| 30.  | ФК30                               | 40,2±0,19                                  | 1,49             | 17,5±0,16                          | 2,86             | 12,5±0,16                         | 4,00             | 9,00±0,24                               | 12,6±0,15                               |
| <b>Average</b>                               |                                    | <b>39,32±1,37</b>                          |                  | <b>18,07±0,49</b>                  |                  | <b>14,63±0,57</b>                 |                  | <b>10,86±0,44</b>                       |   |

**Table 3** – Qualitative traits of wild apple forms' flowers depending on populations

| Populations | Corolla coloring |               |          | The edges of the petals |                |                  | Petal attachment type |                   |
|-------------|------------------|---------------|----------|-------------------------|----------------|------------------|-----------------------|-------------------|
|             | number of forms  | White-pink, % | White, % | Smooth                  | Medium wavy, % | Strongly wavy, % | On a short claw, %    | On a long claw, % |
| GBS         | 13               | 61,54         | 38,46    | 8,5                     | 59,4           | 32,1             | 84,4                  | 15,6              |
| Pikhtovoye  | 30               | 74,3          | 25,7     | 6,7                     | 64,7           | 28,6             | 62,9                  | 37,1              |
| Mushaabay   | 30               | 53,84         | 41,16    | 15,3                    | 60,5           | 24,2             | 89,5                  | 10,5              |
| Krutoe      | 40               | 16,52         | 83,48    | 28,7                    | 44,2           | 27,1             | 22,6                  | 77,4              |

Thus, the materials reviewed indicated that the parameters of the apple flowers were in close connection with the origin of the population, as well as the absolute height of the tree plot.

### Conclusion

The morphological characteristics of the generative organs of apple trees varied significantly by years. In the years with early spring the vegetation could begin in the middle of March; with belated spring it could start in the middle of April. So, during the years of research, the phase of vegetation occurred in March, when the air temperature rises above +12°C. The end of the vegetation period (yellowing the leaves) for wild apple trees was noted at the beginning of the third decade of September. In 2020, despite the protracted autumn and air temperature of +20°C, the complete fall of leaves and the end of the growing season for studied trees were marked at the end of October.

A comparative morphological analysis of flowers allowed us to reveal the intraspecific

variability of the *Malus sieversii*. The studied trees of *Malus sieversii* were distinguished by heterogeneous morphometric parameters. Large-flowered forms were observed both in natural populations and in MBS. In the conditions of the Dzungarian Alatau, the large sizes of flowers were characteristic of the forms in the gorges of Pikhtovaya and Mushabay. Among the variety clones the sample TP-19 selected in the Pikhtovaya distinguished itself by the large size of the corollas.

The average width of the corollas of flowers in variety clones of *Malus sieversii* was  $11.83 \pm 0.5$  mm, while the width of the corolla petals from natural populations was on average  $14.72 \pm 0.58$  mm. The smallest morphometric values of flower corollas were set for the variety clone TP-22. During flowering the most decorative were the variety clones with larger flowers: TM-9 and TP-19. In the gorge Krutoye the apple flowers were smaller and had a low level of variability, indicating that vegetative (shootings) reproduction prevailed in this population.

### Литература

- 1 Байтулин И.О. (2008). К проблеме сохранения хозяйственно-ценных редких видов растений // Известия НАН РК. Серия биол. и медицин. № 1 (265). – С. 3-8.
- 2 Андреев Л.Н., Горбунов У.Н. Сохранение редких и исчезающих растений *ex-situ*: достижения и проблемы // Изучение и охрана разнообразия фауны, флоры и основных экосистем Евразии. Москва С. 19-23
- 3 Муканова Г.С. и др. (2017). Генофонд диких плодовых растений Казахстана // Матер. международной конференции «Изучение, сохранение и рациональное использование растительного мира Евразии». –Алматы, С. 548-550.
- 4 Лангенфельд В. (1991) Яблоня. Морфологическая эволюция, филогения, география, систематика. Рига, 231р. ISBN 5-7966-0379-5.
- 5 Dzhangaliev A.D. et al. (2003) The wild fruit and Nut Plant of Kazakhstan. *Horticultural Reviews*, 371p. ISBN 0-471-21968-1.
- 6 Shadmanova L., Sitpayeva G., Mukanova G., Friesen N. (2019) Molecular-genetic analysis of *Malus sieversii*– comparison of Dzungarian populations *in-situ* and *ex-situ*. *Turczaninowia*. 22 (2). DOI: 10.14258 / turczaninowia. 22.2.0
- 7 Джангалиев А.Д. (1969) Яблоневые леса Заилийского и Джунгарского Алатау. Сохранение и использование. Бот. Инст. Акад. Наук. СССР, Доктор.Диссерт., Ленинград, С.118.
- 8 Zhang H., Zhang M., Wang L. (2015) Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China. *J Arid Land*. 7(2): 264–271. DOI: 10.1007/s40333-014-0044-2

- 9 Исаев И.Б. (2014) *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. // Красная Книга Казахстана. Т. 2. Часть 1. Растения. Под ред. И.О. Байтулина. – Алматы, 52 с.
- 10 Данилов М. П., Ситпаева Г.Т. и др. (2018) Сибирские влияния в растительном покрове Джунгарского Алатау // Мат. XVIII межд. научно-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, С. 246-250.
- 11 Кердяшкин А. В., Шадманова Л.Ш., и др. (2019) Современное состояние яблоневых сообществ северного хребта Жетысуского Алатау // Мат. XVIII межд. Научно-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, С. 276-283.
- 12 Zhou Z. Q., Y.N. Li. (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet Res Crop Evol.* 47:353–357. DOI: 10.1023/A:1008740819941
- 13 Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Hokanson S. C. (2003). Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples from central Asia. *Hort. Rev.* 29:1–61.
- 14 Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур (1973) / под ред. Лобановой. Мичуринск. 380 с.
- 15 Доспехов Б.А. (1979). Методика полевого опыта. М.: Колос. С. 262-289.
- 16 Leonova, N.V. Problems of Horticulture Development these Days. *Economy and Entrepreneurship*, 2017, no. 9-1 (86–1), pp. 949-952.
- 17 Topics in Biostatistics (2007) / edited by Walter T. Ambrosius. – New Jersey: Humana Press inc., 530 p.
- 18 Лакин Г.Ф. (1973) Биометрия. Москва, 338 С.
- 19 Зайцев Г.Н. (1973). Методика биометрических расчетов. Москва: Наука, С. 251.
- 20 Коросов А. В., Горбач В.В. (2010). Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие. Петрозаводск: Издательский дом Петр СУ, 84 p.
- 21 Бияшева З.М., Ловинская А.В., Даулетбаева С.В., Калимагамбетов А.М. (2019) Статистические методы в биологии с программным обеспечением. Учебное пособие. Алматы: Казах. Универ., 107 с.
- 22 Запрыгаева В.И. (1964) Дикорастущие плодовые Таджикистана. Москва, 695 с.
- 23 Серебряков И.Г. (1962). Экологическая морфология растений. Москва, 378 с.
- 24 Бигулин Н. И. (1976). Дендрология. Фенологические наблюдения над листовыми древесными растениями. Ленинград, 70 p.
- 25 Grimshaw J., Bayton R. *New Trees: Recent Introductions to Cultivation*. Kew: Kew Publishing, 2009. – 976 p.

#### References

- 1 Baytulina I.O. (2008) К проблеме сохранения хозяйственно-ценных редких видов растений [On the problem of conservation of economically valuable rare plant species] // *Bulletin of KazNU. Biological Series*. Vol. 1 (265). P. 3-8.
- 2 Andreev L.N., Gorbunov U.N. Soхранenie redkih i ischezashih rastenii ex-situ: dostizheniya i problem [Ex situ conservation of rare and endangered plants: achievements and challenges]// *Izucheniye i ohrana raznoobrazia fauny, flory i osnovnykh ecosystem Evrazii*. Moskva. P. 19-23
- 3 Mukanova G.S. et al. (2017). Genofond dikh plodovykh rastenii Kazakhstana [The gene pool of the wild fruit plants of Kazakhstan] // *Materialy konferentsiya Mat.mezhdun.nauch. konf. "Izucheniye, sohraneniye i ratsionalnoye ispolzovaniye rastitel'nogo mira Evrazii"* Almaty, P. 548-550.
- 4 Langelfelds V. (1991) Yablonya. Morfologicheskaya evolyutsiya, filogeniya, geografya, sistematika [Apple-trees. Morphological evolution, phylogeny, geography, systematics]. Riga, 231p. ISBN 5-7966-0379-5.
- 5 Dzhangaliev A.D. et al. (2003) The wild fruit and Nut Plant of Kazakhstan. *Horticultural Reviews*, 371p. ISBN 0-471-21968-1.
- 6 Shadmanova L., Sitpayeva G., Mukanova G., Friesen N. (2019) Molecular-genetic analysis of *Malus sieversii*– comparison of Dzungarian populations *in-situ* and *ex-situ*. *Turczaninowia*. 22 (2). DOI: 10.14258 / turczaninowia. 22.2.0
- 7 Dzhangaliev A.D. (1969) Yablonevie lesa Zailiiskogo i Djungarskogo Alatau, ih sohraneniye i ispolzovaniye [Apple forest of Zailiyskoi and Dzhungarskoi Alatau, its preservation and use]. Bot. Inst. Acad. Sci. USSR, PhD Diss., Leningrad, P.118.
- 8 Zhang H., Zhang M., Wang L. (2015) Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China. *J Arid Land*. 7(2): 264–271. DOI: 10.1007/s40333-014-0044-2
- 9 Isayev E. B. (2014) *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. // *Krasnaya Kniga Kazakhstana* [*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. In: Red Data Book of Kazakhstan] Vol. 2. Part 1. Plants. Ed. by I. O. Baitulina. Almaty, 52 p.
- 10 Danilov M. P., Sitpayeva G. T. et al. (2018) Sibirskie vliyaniya v rastitel'nom pokrove Sibirskie vliyaniya v rastitel'nom pokrove Dzhungarskogo Alatau [Siberian influences in vegetative cover of Dzungarian Alatau] // Мат. XVIII междун. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, P. 246-250.
- 11 Kerdyashkin A. V., Shadmanova L. Sh. et al. (2019) Sovremennoye sostoyaniye yablonevykh soobshestv severnogo hrebtа Zhetysuskogo Alatau [The current state of apple communities in the Zhetusu Alatau northern ridge] // Мат. XVIII междун. науч.-практ. конф. «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, P. 276-283.
- 12 Zhou Z. Q., Y.N. Li. (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet Res Crop Evol.* 47:353–357. DOI: 10.1023/A:1008740819941



- 13 Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Hokanson S. C. (2003). Collection, maintenance, haracterization, and utilization of wild apples from central Asia. *Hort. Rev.* 29:1–61.
- 14 Programma I metodika sortoizuchenia plodovyh, yagodnyh I orehoplodnyh kultur (1973) / pod red. Lobanova G. A. Michurinsk. 380 p.
- 15 Dospheov B.A. (1979). Field experiment technique [Metodika polevogo opyta]. M.: Kolos. P. 262-289.
- 16 Leonova, N.V. Problems of Horticulture Development these Days. *Economy and Entrepreneurship*, 2017, no. 9-1 (86–1), pp. 949-952.
- 17 *Topics in Biostatistics (2007)* / edited by Walter T. Ambrosius. – New Jersey: Humana Press inc., 530 p.
- 18 Lakin G.F. (1973). *Biomertriya [Biometrium]*. Moscow, 338 C.
- 19 Zaitsev G. N. (1973). *Metodica biometricheskikh raschetov [Biometric calculation method]*. Moskva: Nauka., P. 251.
- 20 Korosov A.V., Gorbach V.V. (2010). *Komputernaya obrabotka biologicheskikh dannyh: metod. posobie [Computer processing of biological data: method allowance]*. Petrozavodsk: PetrSU Publishing House, 84 p.
- 21 Biyasheva Z. M., Lovinskaya A. V., Dauletbaeva S. B., Kalimagambetov A. M. (2019) *Statisticheskie metody v biologii s programnym obespecheniem. Uchebnoe posobie [Statistical methods in biology with software. Tutorial]*. Almaty: Kazakh Univer., 107 p.
- 22 Zapryagaeva V. I. (1964) *Dikorastusshie plodovye Tadjikistana [Wild fruits of Tajikistan]*. Moscow, 695 p.
- 23 Serebryakov I. G. (1962). *Ekologicheskaya morfologiya rastenii [Ecological morphology of plants]*. Moscow, 378 p.
- 24 Bulygin N.E. (1976). *Dendrologia. Fenologicheskie nabludenya nad listvennymi drevesnymi rasteniyami [Dendrology. Phenological observations on deciduous woody plants]*. Leningrad, 70 p.
- 25 Grimshaw J., Bayton R. *New Trees: Recent Introductions to Cultivation*. Kew: Kew Publishing, 2009. – 976 p.



2-бөлім  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Section 2  
**BIOTECHNOLOGY**

---

Раздел 2  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

MPНТИ 34.27.19, 34.27.39, 65.63.35, 62.09.39

<https://doi.org/10.26577/eb.2021.v87.i2.08>

**М.К. Иманбаева<sup>1\*</sup>**, **Р.А. Арынова<sup>2</sup>**, **Ж.К. Масалимов<sup>1</sup>**,  
**А.Ю. Просеков<sup>3</sup>**, **Г. Серикбай<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан

<sup>2</sup>Астанинский филиал ТОО «Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности», Казахстан, г. Нур-Султан

<sup>3</sup>Кемеровский государственный университет, Россия, г. Кемерово

\*e-mail: imanbaeva\_madina@inbox.ru

## СОЗДАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЛАКТОЗООУТИЛИЗИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

На сегодняшний день 60% населения Казахстана страдают гиполактазией. Кроме этого, производство безлактозных кисломолочных продуктов на рынке Казахстана наблюдается в незначительном количестве. В связи с этим, цель настоящего научного исследования заключается в разработке закваски как пробиотического биопрепарата, созданной на основе молочнокислых бактерий, выделенных из казахский традиционных продуктов питания. Практическая значимость исследования заключается в возможности производить безлактозные кисломолочные продукты в промышленных условиях, на основе разработанной технологии. В качестве закваски использовались штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*. Проведенные нами ранее исследования показали, что лактобактерии обладают лактозуютилизующими свойствами. Генетическую идентификацию бактерий проводили на основе гена 16S rRNA, применяли периодическое культивирование при различных диапазонах NaCl, pH. Эксперименты по динамике роста изучали в зависимости от времени культивирования. Исследования показали, что *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* развиваются в кислой среде pH<7. Селективной средой для размножения и развития являются благоприятными, где концентрация соляной кислоты составляет около 5%. Применности полученных результатов исследований актуальна для микробиологической, биотехнологической и молочной промышленности. Практическое значение итогов проведенной работы заключается в импортозамещении дорогостоящих пробиотических препаратов. Разработанный пробиотик по ценовому предложению дешевле зарубежных аналогов, так как создана на основе микроорганизмов, выделенных на территории Республики Казахстан.

**Ключевые слова:** периодическое культивирование, лактобактерии, безлактозная закваска.

M.K. Imanbayeva<sup>1</sup>, R.A. Arynova<sup>2</sup>, Zh.K. Masalimov<sup>1</sup>,  
A.Yu. Prosekov<sup>3</sup>, G. Serikbay<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Nur-Sultan

<sup>2</sup>Astana branch Limited Liability Partnership Kazakh research institute of processing  
and food industry, Kazakhstan, Nur-Sultan

<sup>3</sup>Kemerovo state university, Russia, Kemerovo

\* e-mail: imanbaeva\_madina@inbox.ru

### Creation of a probiotic biological product based on lactose-utilizing microorganisms

Today 60% of the population of Kazakhstan suffers from hypolactasia. In addition, the production of lactose-free fermented milk products in the Kazakhstan market is observed in an insignificant amount. In this regard, the purpose of this scientific research is to develop a starter culture as a probiotic preparation based on lactic acid bacteria isolated from Kazakh traditional food products. The practical significance of the research lies in the ability to produce lactose-free fermented milk products in an industrial environment, based on the developed technology. Strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* were used as a starter culture. Our earlier studies have shown that lactobacilli have lactose-utilizing properties. Genetic identification of bacteria was carried out on the basis of the 16S rRNA gene; batch cultivation was used at different ranges of NaCl, pH. Experiments on the dynamics of growth were studied depending on the time of cultivation. Studies have shown that *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* develop in an acidic pH<7 environment. Selective breeding and development media are favorable, where the concentration of hydrochloric acid is about 5%. The

applicability of the research results obtained is relevant for the microbiological, biotechnological and dairy industries. The practical significance of the results of this work lies in the import substitution of expensive probiotic preparations. The developed probiotic is cheaper than foreign counterparts at the price offer, since it is created on the basis of microorganisms isolated in the territory of the Republic of Kazakhstan.

**Key words:** batch culture, lactobacilli, lactose-free starter culture.

М.К. Иманбаева<sup>1</sup>, Р.А. Арынова<sup>2</sup>, Ж.К. Масалимов<sup>1</sup>,  
А.Ю. Просеков<sup>3</sup>, Г. Серикбай<sup>2</sup>

<sup>1</sup>А.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

<sup>2</sup>Астана филиалы ЖШС «Қазақ қайта өңдеу және тағам өнеркәсіптері ғылыми-зерттеу институты», Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

<sup>3</sup>Кемерово мемлекеттік университеті, Ресей, Кемерово қ.

\*e-mail: imanbaeva\_madina@inbox.ru

### **Лактозаны жоятын микроорганизмдер негізінде пробиотикалық биопрепаратын өнімді құру**

Бүгінгі күні Қазақстан халқының 60% гиполактазиямен ауырады. Сонымен қатар, Қазақстан нарығында лактозасыз ашытылған сүт өнімдерінің өндірісі шамалы мөлшерде байқалады. Осыған орай, осы ғылыми зерттеудің мақсаты – қазақтың дәстүрлі тағам өнімдерінен оқшауланған сүт қышқылды бактерияларға негізделген пробиотикалық препарат ретінде стартерлік дақылдарды дамыту. Зерттеудің практикалық маңыздылығы дамыған технологияға негізделген өндірістік жағдайда лактозасыз ашыған сүт өнімдерін шығару мүмкіндігінде. Стартер дақылы ретінде *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* штамдары қолданылды. Біздің алдыңғы зерттеулеріміз лактобактериялардың лактозаны қолданатын қасиеттері бар екенін көрсетті. 16S rRNA генінің негізінде бактериялардың генетикалық идентификациясы жүргізілді; NaCl, рН әр түрлі диапазонында топтамалық өсіру қолданылды. Өсу уақытына байланысты өсу динамикасы бойынша тәжірибелер зерттелді. Зерттеулер *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* рН<7 қышқыл ортада дамитынын көрсетті. Селективті өсіру және дамыту орталары қолайлы, мұнда тұз қышқылының концентрациясы шамамен 5% құрайды. Алынған зерттеу нәтижелерінің қолданылуы микробиологиялық, биотехнологиялық және сүт өнеркәсібі үшін маңызды. Осы жұмыс нәтижелерінің практикалық маңыздылығы қымбат пробиотикалық препараттарды импортпен алмастыруда. Әзірленген пробиотик шетелдік аналогтарға қарағанда баға бойынша арзан, өйткені ол Қазақстан Республикасының аумағында оқшауланған микроорганизмдер негізінде жасалады.

**Түйін сөздер:** мерзімді өсіру, лактобактериялар, лактозасыз ашытқы.

## **Введение**

Гиполактазия – характеризуется нарушением абсорбции молочного сахара лактозы, после приема лактозосодержащих молочных продуктов [1]. Когортное исследование по рациону питания выявило взаимосвязь расстройства желудочно-кишечного тракта и низкой активностью расщепления молочного сахара (лактозы). Симптомами, которого являются боль в животе, диарея, потеря веса [2].

Как известно молоко и молочные продукты являются источниками Са, К, различных групп витаминов таких как: D, В. Люди страдающие гиполактазией, сталкиваются с дефицитом данных микро и макроэлементов [3]. Группой ученых был проведен мета-анализ, где изучали сыворотку крови людей страдающих гиполактазией. Было установлено, что низкий показатель витамина D связано со сни-

женной минеральной плотности костной ткани [4]. Также была обнаружена, положительная корреляция с болезнью пищеварительной системы и частотой переломов [5,6,7]. В связи с тем, что воспалительные заболевания кишечника и снижение плотности костей связаны с гиполактазией. Ученые предлагают использовать пробиотики на основе консорциумов лактобактерий с целью уменьшения симптомов непереносимости лактозы [8].

Ряд исследований показал, что определенные штаммы молочнокислых бактерий, возможно использовать в пробиотических целях в качестве пищевых добавок, у пациентов с непереносимостью лактозы. Так как микроорганизмы проявляли специфическую активность к β-галактозидазе [9]. Пробиотики определяются как живые микроорганизмы, полезные для здоровья при употреблении в пищу с высоким количеством жизнеспособных клеток. Лактобак-

терии наиболее часто используются в качестве пробиотиков [10,11]. Многие ученые из различных стран выделяют новые молочнокислые бактерии с функциональными свойствами из естественных источников, такие как традиционные молочнокислые ферментированные продукты питания. Выбор в качестве пробиотического микроорганизма основывается на нескольких исследованиях: устойчивости к желчным солям, устойчивости к низкому или высокому рН, подвергают адгезии, моделирование условий желудочно-кишечного тракта и способности иметь высокую жизнеспособность [12].

В своих исследованиях ряд ученых обнаружили определенные штаммы молочнокислых бактерий, ферментирующих лактозу, таких как *Faecaibacterium*, *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* [13].

На сегодняшний день, все больше исследований направлено на создание функциональных продуктов питания для людей страдающих гиполактазией. Так группа ученых разработали безлактозный функциональный йогурт, ферментированный пробиотическими культурами [14]. Другая группа ученых применяли метод хромогенного культивирования. В процессе совместного культивирования различных ассоциаций молочнокислых бактерий. На основе подсчета жизнеспособных штаммов лактобактерий в ферментированном молоке селективно выбранных на основе дифференциальной активности  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -глюкозидазы [15].

Польза ферментированных продуктов заключается в изменении микробиоты желудочно-кишечного тракта, что оказывает положительное влияние по предотвращению остеопороза и других заболеваний ассоциированных с гиполактазией [16].

Благодаря современным методам исследования, сегодня доступные диагностические методы основанные на нескольких подходах, включая тест на лактозное дыхание (LBT), тест на толерантность к лактозе (LTT), генетический тест и оценку активности лактазы в образцах биопсии тощей кишки [17].

Согласно статистическим данным, самый высокий показатель встречаемости данного заболевания зафиксировано в странах Юго-Восточной Азии от 15% до 100%, Северной Америке 79%, Латинская Америка 51%, Европейские страны от 5% до 50% [18].

На сегодняшний день встречаемость гиполактазии в Казахстане составляет 60 %. В свя-

зи с этим разработка безлактозной закваски на основе штаммов выделенных из традиционных казахских молочных продуктов питания является актуальной. Полученные результаты исследований могут применяться в таких отраслях как: микробиологическая, биотехнологическая и молочная промышленность. Разрабатываемая технология имеет социальный и экономический эффект. Основной рынок безлактозных молочных продуктов экспортируется из стран ближнего и дальнего зарубежья. Таким образом, итогов проведенной работы заключается в импортозамещении дорогостоящих пробиотических препаратов. Разработанный пробиотик по ценовому предложению дешевле зарубежных аналогов.

## Материалы и Методы

### *Выделение и изучение культурально-морфологических свойств молочнокислых бактерий*

Для получения чистых культур из жидких и полужидких гомогенных продуктов (кумыс, айран и сметана) был использован метод десятичных разведений с последующим пересевом на твердую питательную среду (MRS, HiMedia), которая является селективной по отношению к молочнокислым бактериям [19]. Твердые продукты питания (творог, масло, курт) растирали ступкой до однородной кашеобразной массы, после чего также получали разведения и производили посев газоном на чашки. Чашки помещали в термостат на 2-е суток при 37 °С. Отбор и определение принадлежности выделенных изолятов к МКБ проводили окраской по Грамму, подвижности, и микроскопии мазков [20].

### *Генетическая идентификация бактериальных культур на основе гена 16S rRNA*

Выделение ДНК проводили методом, описанным Kate Wilson, который позволяет эффективно выделять ДНК из грамтрицательных и грамположительных культур.

Аmplификация фрагмента 16S rRNA гена для бактерий. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами [21] 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 25 нг ДНК, 1 Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплифи-

кации включала длительную денатурацию 95 °С в течение 3 минут; 32 цикла: 95 °С – 30 секунд, 55 °С- 40 секунд, 72 °С – 60 секунд; заключительная элонгация 10 минут при 72 °С. ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом, используя Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [22].

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Полученную нуклеотидную последовательность сопоставляли с нуклеотидными последовательностями международных баз данных.

*Определение оптимального диапазона кислотности, концентрации NaCl при температуре 37 °С при периодическом культивировании*

Биомассу культур микроорганизмов культивируют в жидкой питательной среде MRS при t 25 °С на шейкере в течение 72, 120, 168 часов. Затем готовят 9 пробирок с автоклавированной стерильной дистиллированной водой объемом 9 мл. Для посева на плотные питательные среды производятся из разведений 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:10000 и т.д [23]. Свежеприготовленную агарированную питательную среду охлаждают до 48–50 °С. Далее ровным слоем распределяя по поверхности стерильной чашки Петри толщиной 3–5 мм. Стерильной пипеткой вносят 12 мл исследуемой культуры из соответствующего разведения, предварительно перемешанного. Распределение микроорганизмов осуществляется стерильным шпателем. При посеве из разных разведений применяют новую стерильную пипетку. Необходимо осуществлять 2 – параллельных посева. Чашки Петри помещают в термостат, чашками вниз, устанавливая оптимальную температуру для культивирования исследуемых микроорганизмов [24].

Далее 100 мл свежеприготовленной жидкой питательной среды MRS бульон стерилизован-

ной при t 120 °С под давлением 1А в автоклаве «Стерилизатор паровой ВК- 75-01» в течение часа. Затем в стерилизованные питательные среды в ламинар боксе «LAMSYSTEM» добавляли NaOH (гидроксид натрия) для увеличения диапазона pH, HNO<sub>3</sub> (азотную кислоту) для уменьшения диапазона pH. Диапазон pH жидкой питательной среды анализировали на pH-метром Mettler Toledo SevanCompact. Культивирование осуществлялось при температуре 25 °С, в колбах объемом 250 мл на шейкере в течение 3 суток (72 часа), 5 суток (120 часов), 7 суток (168 часов). Эксперимент осуществлялся в трех повторностях [19].

Затем в стерилизованные жидкие питательные среды MRS бульон в ламинар боксе «LAMSYSTEM» добавляли 2 гр. NaCl, 5 гр. NaCl, 7 гр. NaCl. Далее добавлял маточную культуру лактобактерий *Lactobacillus acidophilus* в концентрации 5% от общего объема питательной среды. Культивирование осуществлялось при температуре 25 °С, в колбах объемом 250 мл на шейкере в течение 3 суток (72 часа), 5 суток (120 часов), 7 суток (168 часов). Для обработки полученных статистических данных использовали: Чашечный метод количественного учета микроорганизмов. Метод Коха.

Общую микробную обсемененность рассчитывают по количеству выросших колоний т.е. количество КОЕ в 1 мл определяли по формуле:

$$M = \frac{a \times 10n}{V} \quad (1)$$

где, а – количество выросших колоний; 10n – разведение; V – посевная доза (0,1мл) [25].

## Результаты и Обсуждения






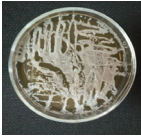
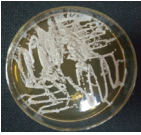

*Выделение и изучение культурально-морфологических свойств молочнокислых бактерий*

Коллекция чистых молочнокислых бактерий была выделена из казахских традиционных кисломолочных продуктов питания таких как: айран, кумыс, шубат, иримшик, курт, домашнее масло. Согласно таблице 1 штаммы отбирались согласно следующим признакам, характерным для молочнокислых бактерий: однородные колонии белого или беловато-молочного цвета с ровными краями и выпуклой поверхностью. Изолированные отдельно стоящие культуры, возможно, было получить на 3 или 4ом пересеве.

Таблица 1 – Накопление чистой культуры микроорганизмов выделенных из продуктов домашнего приготовления

| Посев   | Результаты пересева   |
|---|---|
| Микроорганизмы выделенные из кумыса   |   |
|    | <br>Форма круглая с гладким краем, поверхность матовая, профиль плоский. Средние колонии диаметром 4 мм, имеют белый цвет. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.                           |
| Микроорганизмы выделенные из айрана   |   |
|    | <br>Форма круглая с волнистым краем поверхность матовая, изогнутый профиль. Однородная структура, имеющая мягкую консистенцию. Колонии средние диаметром 3 мм, имеет белый цвет.                                |
| Микроорганизмы выделенные из шубата   |   |
|   | <br>Форма круглая с гладким краем, поверхность матовая, профиль плоский. Средние колонии диаметром 4 мм, имеют белый цвет. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.                          |
| Микроорганизмы выделенные из иримшик  |   |
|  | <br>Форма округлая с неправильными краями, профиль плоский поверхность колонии блестящее, средние колонии диаметром 3 мм, имеет серо-белого цвета. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию. |
| Микроорганизмы выделенные из домашнего молока                                       |   |
|  | <br>Форма круглая, края волокнистые, профиль плоский, колонии блестящие, мелкие точечные диаметром 1 мм. Однородная структура. Имеет хрупкую консистенцию, рассыпающиеся при прикосновении петлей.            |
| Микроорганизмы выделенные из айрана   |   |
|  | <br>Форма круглая с валиком по краю, края и поверхность гладкие, профиль изогнутый, матовый, белого цвета. Диаметр 4 мм.  |



| Посев  | Результаты пересева   |
|--|---|
| Микроорганизмы выделенные из курта   |   |
|   |  <p>Овальной или круглой формы, поверхность гладкая, профиль плоский, блестящая, белого цвета. Диаметр 3 мм.</p>  |
|  |   |
|  |  <p>Форма круглая, поверхность гладкая, профиль плоский, блестящий, белого цвета. Диаметр 6 мм.</p>               |
| Микроорганизмы выделенные из ирмшик  |   |
|   |    |
|  | <p>Круглая форма, Форма круглая, края волокнистые, профиль плоский, колонии блестящие, средние колонии диаметром 3 мм, белого цвета. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.</p> |
|  |   |
| <p>Форма круглая с гладким краем, поверхность блестящая, профиль плоский. Средние колонии диаметром 2 мм, имеют белый цвет. Однородная структура. Имеет мягкую слизистую консистенцию.</p> |   |
| Микроорганизмы выделенные из масло (домашнее)  |   |
|   | <p>Форма круглая с валиком по краям, края волнистые, поверхность шероховатая, матовая, белого цвета. Диаметр 5 мм</p>   |

*Генетическая идентификация бактериальных культур на основе гена 16S rRNA*

В результате генетической идентификации с помощью нуклеотидной последовательности на основе гена 16S rRNA, было установлено, что 13 полученных штаммов молочнокислых бактерий относятся к *Enterococcus* и *Lactobacillus*. Результаты генетической идентификации представлены в таблице 2.

*Определение оптимального диапазона кислотности, концентрации NaCl при температуре 37 С° при периодическом культивировании*

В качестве объектов, входящих в состав закваски для производства безлактозных кисломолочных продуктов были использованы штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*. В процессе периодического культивирования

определены оптимальные диапазоны кислотности (рН), солёности среды и температурного режима объектов исследования.

Обращая внимание на мутность жидкой питательной среды можно визуально диагностировать положительный процесс культивирования *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* на 3-ие сутки (72 часа), 5-ые сутки (120 часов), 7-ые сутки (168 часов). Таким образом, в колбах, где проводили культивирование в жидких питательных средах MRS, отмечается помутнение и пена. Что свидетельствует о положительной динамике роста *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

На 72 сутки были взяты микроорганизмы из разведений под пробирками № 6,7,8. При посадке на 120 сутки из пробирок № 5,6,7, затем на 168 сутки из пробирок № 4,5,6 (рисунок 1).

**Таблица 2** – Результаты генетической идентификации

| Условные обозначения | Наименование                     | Субстрат выделения | % идентичности |
|----------------------|----------------------------------|--------------------|----------------|
| P 1                  | <i>Enterococcus thailandicus</i> | шубат              | 99,84          |
| P 2                  | <i>Enterococcus lactis</i>       | кумыс              | 100            |
| P 3                  | <i>Enterococcus durans</i>       | иримшик            | 99,68          |
| P 4                  | <i>Enterococcus faecium</i>      | айран              | 99,54          |
| P 5                  | <i>Lactobacillus zeae</i>        | домашнее масло     | 100            |
| P 6                  | <i>Lactobacillus paracasei</i>   | кумыс              | 100            |
| P 7                  | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>   | курт               | 99,48          |
| P 8                  | <i>Lactobacillus fermentum</i>   | шубат              | 99,65          |
| P 9                  | <i>Lactobacillus gorillae</i>    | айран              | 100            |
| P 10                 | <i>L. reuteri</i>                | шубат              | 99,59          |
| P 11                 | <i>L. johnsonii</i>              | иримшик            | 100            |
| P 12                 | <i>L. helveticus</i>             | курт               | 99,74          |
| P 13                 | <i>L. curvatus</i>               | айран              | 99,81          |



**Рисунок 1** – Приготовление разведения для периодического культивирования

Согласно описанному процессу, проведенные исследования дали возможность установить высокий, низкий титр клеток в различных условиях среды (диапазона кислотности, солёности и температурного режима).

Определено, что на 72 часу развития штаммы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* показали незначительное число образовавшихся колоний. Данное явление связано с адаптацией вносимых бактерий в питательные среды с за-

данными условиями и вхождением микроорганизмов в лаг-фазу своего роста.

Обратив внимание на количественный показатель КОЕ/мг возможно сделать заключение что, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* имеют максимальное значение на 5ые сутки (120 часов). Биомасса бактерий с низким титром клеток выявлена на 168 сутки.

В процессе периодического культивирования определены оптимальные диапазоны кислотности (рН), концентрация соляной кислоты и выход биомассы при культивировании температурном режиме соответствующему 37 С°.

Полученные данные будут необходимы для получения жидкой и сухой формы закваски для производства безлактозных кисломолочных продуктов. На основе, живых культур *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

Как известно, основным показателем для естественного роста бактерий является реакция среды. В результате изменения кислотности в критическую сторону наблюдается снижение показателей жизнедеятельности штаммов микроорганизмов. Несмотря на другие оптимальные условия окружающей среды.

В нашем исследовании, был изучен процесс динамики роста *Lactobacillus acidophilus* и

*Enterococcus faecium* в MRS питательной среде, имеющий различный диапазон кислотности рН 5, 6,4, 8,5.

Согласно рисунку 2 максимальная динамика роста *Lactobacillus acidophilus* наблюдается на 5-ые сутки (120 часов), КОЕ/мг  $7,8 \times 10^8$ , где, установлен оптимальный уровень кислотности среды (рН), который имеет показатель 5. В диапазоне рН 6,4 – 8,5 по сравнению с рН 5 имеют меньшую степень роста.

Таким образом, было определено, что кислые среды благоприятно влияют на рост *Lactobacillus acidophilus*, чем нейтральные и щелочные питательные среды.

Наиболее благоприятный уровень кислотности для энтерококков *Enterococcus faecium* является рН 6,4. Где, также наблюдается логарифмический рост. При этом на 3ие сутки (72 часа) зафиксированных КОЕ/мг  $5,5 \times 10^9$ , максимальное число КОЕ/мг  $5,8 \times 10^8$  обнаружено также на 120 сутки. На 7ые сутки КОЕ/мг  $3,8 \times 10^7$ , что свидетельствует о снижении показателей жизнедеятельности микроорганизма, приводящий к уменьшению динамики роста *Enterococcus faecium*. Полученные данные свидетельствуют о том, что для *Enterococcus faecium* развивается в кислой среде (рН <7).

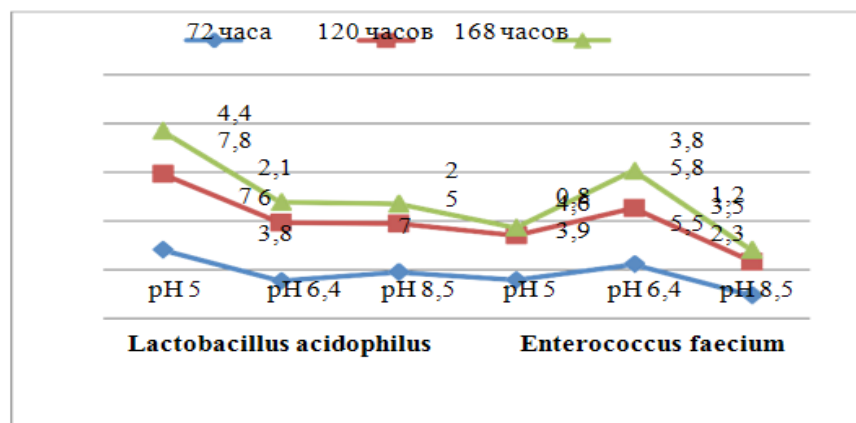


Рисунок 2 – Оптимальные диапазоны кислотности (рН)

Выживаемость и динамика роста пробиотических микроорганизмов в кислых условиях среды являются ключевым фактором. Исследования по культивированию *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* в селективной среде с концентрацией NaCl 2%, 5%, 7%.

Штаммы благоприятно развиваются в питательной среде имеющий коэффициент солености

в 5% (рисунок 3). На 120 сутки культивирования объектов исследования, может характеризоваться как экспоненциальная фаза роста. Так как *Lactobacillus acidophilus* имеет  $6,7 \times 10^8$  КОЕ/мг, *Enterococcus faecium*  $4 \times 10^8$  КОЕ/мг. Культивируемые микроорганизмы по мере приближения к стационарной фазе (168 часов) показывает снижение роста по сравнению с 120 часами культивирования

ния. *Lactobacillus acidophilus* от 6,7 КОЕ/мг (120 ч) до 4,3 КОЕ/мг (168 ч), *Enterococcus faecium* от  $4 \times 10^8$  КОЕ/мг (120 ч) до  $2,5 \times 10^7$  КОЕ/мг (168 ч).

Полученные данные периодического культивирования при установленном температурном режиме соответствующему 37°C°.

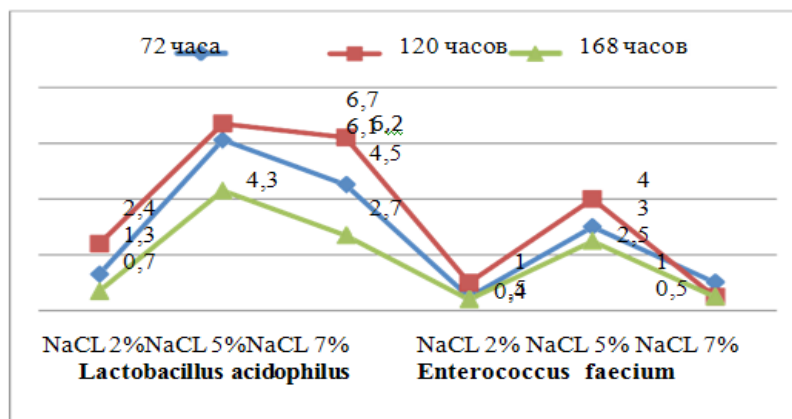


Рисунок 3 – Оптимальные диапазоны концентрация соляной кислоты (NaCl)

Известно, что главным фактором для культивирования микроорганизмов важную роль играет температурный режим. Нормальная температура желудочно-кишечного тракта составляет 37°C°. Культивирование *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* при температуре 37°C° осуществлялось также в течение 72, 120 и 168 часов.

Было установлено, что логарифмическое увеличение численности культуры зафиксировано до стационарной фазы роста на 5-ые сутки при периодическом культивировании. Численность *Lactobacillus acidophilus* с  $5,5 \times 10^9$  КОЕ/мг (72 часа) увеличивалось до  $6,8 \times 10^8$  КОЕ/мг (120 часа), *Enterococcus faecium* имеет аналогичную тенденцию к максимальному росту колоний от 72 часов  $1,9 \times 10^9$  КОЕ/мг до 120 часов  $2,5 \times 10^8$  КОЕ/мг. К 168 часам (7 сутки) указывают на снижение колониеобразующих единиц.

### Заключение, выводы

В рамках реализации проекта «Технология производства безлактозных кисломолочных продуктов» в лаборатории «Микробиология и биотехнология» проведены исследования по изучению динамики роста с целью создания пробиотического биопрепарата на основе лактозутилизующих микроорганизмов.

В результате на основании проведенных нами исследований была создана коллекция из 13 штаммов молочнокислых бактерий выделенных из казахских домашних традиционных

кисломолочных продуктов. Определена генетическая идентификация лактобактерий и изучены культурально-морфологические свойства.

Установлен оптимальный показатель кислотности среды (pH) для *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* является кислая среда. *Lactobacillus acidophilus* – pH 5, *Enterococcus faecium* – pH 6,4.

Наиболее благоприятной средой для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* является среда, имеющая концентрацию соляной кислоты около 5%.

На выращенной питательной среде MRS-агара с концентрацией соляной кислоты (NaCl) – 2% и 7% рассматриваемые изоляты бактерий *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, показали плохой рост на 3ий, 5ый и 7ый сутки.

Перечисленные исследования способствовали определению оптимумов, различных диапазонов кислотности, солености, при которых выявляются максимальный рост и выход биомассы *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*.

На основе полученных данных были установлены параметры культивирования на ферментере для получения безлактозной закваски в жидкой форме. Проведенные исследования способствуют разработки безлактозной закваски в порошкообразном и жидком виде.

На данном этапе ведутся работы по внедрению и применению полученной безлактозной закваски в производство.

## Конфликт интересов

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

## Благодарности

Авторы статьи благодарны профессору, доктору биологических наук Арыновой Райхан Ахметовне за руководство над научно-исследовательским проектом «Технология производства безлактозных кисломолочных продуктов» за ценные рекомендации по выполнению данного проекта.

## Источники финансирования

Исследовательская работа проводилась в рамках научно-технической программы (НТП) № BR05236766 «Создание продуктов здорового питания с функциональной направленностью на основе сельскохозяйственного сырья» по приоритетному направлению «Наука о жизни и здоровье» на 2018 -2020 годы по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 101 «Программно-целевого финансирования субъектов научной и/или научно-технической деятельности» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

## Литература

- 1 Yang J., Fox M., Cong Y. Lactose intolerance in irritable bowel syndrome patients with diarrhoea: the roles of anxiety, activation of the innate mucosal immune system and visceral sensitivity // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 9. – P. 302-311.
- 2 Wasuwanich P., Choudry H., Ingviya T., Scheimann O., Karla J., Yeung A., Karwowski C., Billet S., Buford N. A retrospective study on the association of gastrointestinal symptoms in children with low lactase activity and low activity of other disaccharidases. // *BMC Gastroenterology.* – 2020. – Vol. 12. – P. 294 – 306.
- 3 Savaiano DA., Ritter AJ., Klaenhammer TR., James GM., Longcore AT., Chandler JR. Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial // *Nutr J.* – 2013. Vol. 11. – P. 267 – 278.
- 4 Mądry E., Krasinśka B., Drzymala-Czyż S., Sands D., Lisowska A., Grebowiec P. Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. // *Eur J Hum Genet.* – 2012. – Vol. 10. P. 109–119.
- 5 Fedota O., Babalian V., Ryndenko V., Belyaev S., Belozorov I. Lactose tolerance and risk of multifactorial diseases on the example of gastrointestinal tract and bone tissue pathologies // *Georgian medical news Issue.* – 2020. – Vol. 12. – P. 243 – 255.
- 6 Lomer M., Parkes G., Sanderson J. Lactose intolerance in clinical practice—myths and realities // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 15. – P. 103 – 118.
- 7 Suchy FJ., Brannon PM., Carpenter TO. National institutes of health consensus development conference: Lactose intolerance and health // *Ann Intern Med.* – 2010. Vol. – 8. – P. 792-800.
- 8 Ratajczak A., Rychter A., Zawada A., Dobrowolska A., Kazmierczak I. Lactose intolerance in patients with inflammatory bowel diseases and dietary management in prevention of osteoporosis // *Nutrition.* – 2020. – Vol. 12. – P. – 139- 151.
- 9 Fassio F., Facioni MS., Guagnini F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives // *Nutrients.* – 2018. – Vol. 15. – P. 187 – 202.
- 10 Meidustria T.R., Sembiring L., Rahayu E.S., Haedar N., Dwyana Z. Survival of *Lactobacillus plantarum* dad 13 in probiotic cheese making // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* – 2020. – Vol. 15. – P. 120-135.
- 11 Escobar-Ramírez M.C., Ordaz J.J., Escorza-Iglesias V.A., Rodríguez-Serrano G.M., Contreras-López E., Ramírez-Godínez J., Castañeda-Ovando A., Morales-Estrada A.I., Felix-Reyes N., González-Olivares L.J. *Lactobacillus pentosus* AB-HEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage // *Rev Argent Microbiol.* – 2020. – Vol. 9. –P. 305 – 314.
- 12 Larissa P., Margalho N., Genesy P., Jorge Deise A. P., Noleto Christian E., Júlia S., Marcos F. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: from screening to in product approach. // *Microbiol Res.* – 2021. – Vol. 15. – P. 242 – 254.
- 13 Azcarate-Peril MA., Ritter AJ., Savaiano D. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 15. – P. 114 – 129.
- 14 Ulisa Pachekrepapol U., Somboonchai N., Krimjai W. Physicochemical, rheological, and microbiological properties of lactose-free functional yogurt supplemented with fructooligosaccharides // *J Food Process Preserv.* – 2020. – Vol. 15. – P. 150 – 165.
- 15 Galat A., Dufresne J., Combrisson J., Thépaut J., Boumghar-Bourtchai L., Boyer M., Fourmestreaux M. Novel method based on chromogenic media for discrimination and selective enumeration of lactic acid bacteria in fermented milk products // *Food Microbiol.* – 2016. – Vol. 10. – P. 163- 173.
- 16 Rizzoli R., Biver E. Effects of Fermented Milk Products on Bone // *Calcif Tissue Int.* – 2018. – Vol. 12. P. – 102-114.
- 17 Borghini R., Donato G., Alvaro D., Picarelli A. New insights in IBS-like disorders: Pandora's Box has been opened; re-view // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* – 2017. – Vol. 10. P. – 79-89.
- 18 Scrimshaw NS., Murray EB. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance // *Am J Clin Nutr.* – 2015. – Vol. 15. – P. 107-122.
- 19 Егорова Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии // МГУ. – 1995. – С. 186 – 198
- 20 Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии // Академия. – 2005. – С. 119 – 129.
- 21 Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M. et al. Outbreak of Infection With *Acinetobacter* Strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit // *Infection control and hospital epidemiology.* – 2006. – Vol. 27. – P. 397 – 424.

- 22 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4376.
- 23 Егорова Н.С. Микробиология // Высшая школа. – 1989. – С. 321 – 376.
- 24 Евсеев В. Лабораторный практикум микроорганизмов // Курган. – 2008.- С. 131 – 143.
- 25 ГОСТ 26809-86 "Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу" // Стандартинформ. – 2010. С. 10 – 258.

### References

- 1 Yang J., Fox M., Cong Y. Lactose intolerance in irritable bowel syndrome patients with diarrhoea: the roles of anxiety, activation of the innate mucosal immune system and visceral sensitivity // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 9. – P. 302-311.
- 2 Wasuwanich P., Choudry H., Ingviya T., Scheimann O., Karla J., Yeung A., Karwowski C., Billet S., Buford N. A retrospective study on the association of gastrointestinal symptoms in children with low lactase activity and low activity of other disaccharidases. // *BMC Gastroenterology.* – 2020. – Vol. 12. – R. 294 – 306.
- 3 Savaiano DA., Ritter AJ., Klaenhammer TR., James GM., Longcore AT., Chandler JR. Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial // *Nutr J.* – 2013. Vol. 11. – P. 267 – 278.
- 4 Mądry E., Krasieńska B., Drzymała-Czyż S., Sands D., Lisowska A., Grebowiec P. Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. // *Eur J Hum Genet.* – 2012. – Vol. 10. R. 109–119.
- 5 Fedota O., Babalian V., Ryndenko V., Belyaev S., Belozorov I. Lactose tolerance and risk of multifactorial diseases on the example of gastrointestinal tract and bone tissue pathologies // *Georgian medical news* Issue. – 2020. – Vol. 12. – R. 243 – 255.
- 6 Lomer M., Parkes G., Sanderson J. Lactose intolerance in clinical practice—myths and realities // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 15. – P. 103 – 118.
- 7 Suchy FJ., Brannon PM., Carpenter TO. National institutes of health consensus development conference: Lactose intolerance and health // *Ann Intern Med.* – 2010. Vol. – 8. – P. 792-800.
- 8 Ratajczak A., Rychter A., Zawada A., Dobrowolska A., Kazmierczak I. Lactose intolerance in patients with inflammatory bowel diseases and dietary management in prevention of osteoporosis // *Nutrition.* – 2020. – Vol. 12. – R. – 139- 151.
- 9 Fassio F., Facioni MS., Guagnini F. Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives // *Nutrients.* – 2018. – Vol. 15. – R. 187 – 202.
- 10 Meidustria T R., Sembiring L., Rahayu E S., Haedar N, Dwyana Z. Survival of *Lactobacillus plantarum* dad 13 in probiotic cheese making // *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.* – 2020. – Vol. 15. – R. 120-135.
- 11 Escobar-Ramírez M.C., Ordaz J.J., Escorza-Iglesias V.A., Rodríguez-Serrano G.M., Contreras-López E., Ramírez-Godínez J., Castañeda-Ovando A., Morales-Estrada A.I, Felix-Reyes N., González-Olivares L.J. *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage // *Rev Argent Microbiol.* – 2020. – Vol. 9. –R. 305 – 314.
- 12 Larissa P., Margalho N., Genesy P., Jorge Deise A. P., Noletto Christian E., Júlia S., Marcos F. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: from screening to in product approach. // *Microbiol Res.* – 2021. – Vol. 15. – P. 242 – 254.
- 13 Azcarate-Peril MA., Ritter AJ., Savaiano D. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol. 15. – R. 114 – 129.
- 14 Ulisa Pachekrepapol U., Somboonchai N., Krimjai W. Physicochemical, rheological, and microbiological properties of lactose-free functional yogurt supplemented with fructooligosaccharides // *J Food Process Preserv.* – 2020. – Vol. 15. – R. 150 – 165.
- 15 Galat A., Dufresne J., Combrisson J., The'paut J., Boumghar-Bourthai L., Boyer M., Fourmestreaux M. Novel method based on chromogenic media for discrimination and selective enumeration of lactic acid bacteria in fermented milk products // *Food Microbiol.* – 2016. – Vol. 10. – R. 163- 173.
- 16 Rizzoli R., Biver E. Effects of Fermented Milk Products on Bone // *Calcif Tissue Int.* – 2018. – Vol. 12. R. – 102-114.
- 17 Borghini R., Donato G., Alvaro D., Picarelli A. New insights in IBS-like disorders: Pandora's Box has been opened; re-view // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* – 2017. – Vol. 10. R. – 79-89.
- 18 Scrimshaw NS., Murray EB. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance // *Am J Clin Nutr.* – 2015. – Vol. 15. – P. 107-122.
- 19 Егорова Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии // МГУ. – 1995. – С. 186 – 198
- 20 Нетрусова А.И. Практикум по микробиологии // Академия. – 2005. – С. 119 – 129.
- 21 Vegas E.Z.S., Nieves B., Araque M. et al. Outbreak of Infection With *Acinetobacter* Strain RUH 1139 in an Intensive Care Unit // *Infection control and hospital epidemiology.* – 2006. – Vol. 27. – P. 397 – 424.
- 22 Werle E., Schneider C., Renner M. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4354-4376.
- 23 Егорова Н.С. Микробиология // Высшая школа. – 1989. – С. 321 – 376.
- 24 Евсеев В. Лабораторный практикум микроорганизмов // Курган. – 2008.- С. 131 – 143.
- 25 ГОСТ 26809-86 "Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу" // Стандартинформ. – 2010. С. 10 – 258.



**А.З. Маметова<sup>1\*</sup>**, **А.А. Успабаева<sup>1</sup>**,  
**А.С. Бабенко<sup>2</sup>**, **А.К. Аденбаева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Қазақстан, Шымкент қ.

<sup>2</sup>Ұлттық зерттеушілік Томск мемлекеттік университеті, Ресей, Томск қ.

\*e-mail: Akmaral\_mametova@mail.ru

## ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАННЫҢ МҰНАЙМЕН ЛАСТАНҒАН ТОПЫРАҒЫНАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН КӨМІРСУТЕГІН ТОТЫҚТЫРУШЫ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Қазіргі таңда әлемнің көптеген елдерінде және Қазақстанда мұнай өндірісі саласы экономикалық көрсеткіштердің өсуінің негізгі бағыты болып табылады. Алайда, мұнай өндірісінің қарқынды дамуы қоршаған ортаға айтарлықтай кері әсерін тигізуде. Мұнай өндіру технологиясының жақсы жетілдірілмеуі, тасымалдау кезіндегі апаттар және мұнай өнімдерін сақтау орындары атмосфера, ағын сулар мен топырақтың ластануына алып келеді. Мұнаймен ластанған ортаны тазарту мәселелерін шешу үшін қазіргі таңда мұнай және мұнай өнімдерінің микробиологиялық деструкциясына негізделген биологиялық әдістер сәтті қолданылуда. Әлем ғалымдарының зерттеулері бойынша, көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдер мұнай және мұнай өнімдерін ыдырата алатындығы дәлелденіп, жоғары нәтижеге қол жеткізілген.

Бұл жұмыстың негізгі мақсаты құрғақ климатты Оңтүстік Қазақстанның мұнаймен ластанған топырақтан бөлініп алынған көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдерді идентификациялау болып табылады.

Оңтүстік Қазақстанның мұнаймен ластанған топырағынан мұнай қалдықтарын тазалауда пайдалануға болатын көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдердің белсенді 5 штамына идентификация жасалды. Микроорганизмдердің культуралды-морфологиялық және таксономиялық белгілері анықталды.

Молекулярлық-генетикалық зерттеу нәтижелері бойынша бөлініп алынған микроорганизмдер әртүрлі физиологиялық топтарға жатқызылды: *Pseudomonas thivervalensis* KMA4.1, *Devosia neptuniae* RMA7, *Glutamicibacter arilaitensis* MMA4, *Aspergillus flavus* Mach1, *Penicillium chrysogenum* Mach2. Зерттелген штамдардың ең жақын туыстас штамдармен филогенетикалық талдаулары құрылды.

**Түйін сөздер:** мұнай және мұнай өнімдері, *Pseudomonas thivervalensis* KMA4.1, *Devosia neptuniae* RMA7, *Glutamicibacter arilaitensis* MMA4, *Aspergillus flavus* Mach1, *Penicillium chrysogenum* Mach2.

A.Z. Mametova<sup>1\*</sup>, A.A. Uspabaeva<sup>1</sup>, A.S. Babenko<sup>2</sup>, A.K. Adenbayeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>M. Auezov South Kazakhstan University, Kazakhstan, Shymkent

<sup>2</sup>National Research Tomsk State University, Russia, Tomsk

\*e-mail: Akmaral\_mametova@mail.ru

### Identification of hydrocarbon-oxidizing microorganisms isolated from oil-contaminated soils of South Kazakhstan

Currently, one of the main sources of environmental pollution is oil and oil products. To solve the problems of soil cleaning, methods of biological reclamation have recently been successfully used, which are based on the activation of microbiological destruction of oil and oils products. The use of mixed strains of microorganisms allows the complete utilization of oil and oil products. The use of active hydrocarbon-oxidizing microorganisms in the cleaning of oil-contaminated objects is a promising and effective method. The aim of the work is to identify hydrocarbon-oxidizing microorganisms isolated from oil-contaminated soils of South Kazakhstan.

From the oil-contaminated soils of South Kazakhstan, 5 active strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms have been isolated and identified, which can be promising for the disposal of oil-containing waste. Cultural-morphological and taxonomic features of microorganisms were revealed. Identification of the isolated cultures by molecular genetic characteristics were assigned to different physiological groups: *Pseudomonas thivervalensis* KMA4.1, *Devosia neptuniae* RMA7, *Glutamicibacter arilaitensis*

MMA4, *Aspergillus flavus* Mach1, *Penicillium chrysogenum* Mach2. A phylogenetic analysis of the studied strains was carried out.

**Key words:** oil and oil products, *Pseudomonas thivervalensis* KMA4.1, *Devosia neptuniae* RMA7, *Glutamicibacter arilaitensis* MMA4, *Aspergillus flavus* Mach1, *Penicillium chrysogenum* Mach2.

А.З. Маметова<sup>1\*</sup>, А.А. Успабаева<sup>1</sup>, А.С. Бабенко<sup>2</sup>, А.К. Аденбаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Южно-Казахстанский университет им. М. Ауэзова, Казахстан, г. Шымкент

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, г. Томск

\*e-mail: Akmaral\_mametova@mail.ru

### Идентификация углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв Южного Казахстана

С каждым годом возрастает добыча и переработка углеводородного сырья для решения топливно-энергетических потребностей республики. Однако интенсификация переработки и добычи нефти сопровождается загрязнением окружающей среды и, в частности, почвы. Загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами вызывает депрессию почвенной микрофлоры, изменяется структура биоценозов. По результатам исследования ученых мира доказано что углеводородокисляющие микроорганизмы могут использовать нефть и нефтепродукты в качестве источника энергии. Применение активных углеводородокисляющих микроорганизмов при очистке нефтезагрязненных объектов является перспективным и эффективным методом.

Цель работы – идентификация углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв в условиях аридного климата Южного Казахстана.

Из нефтезагрязненных почв Южного Казахстана идентифицированы 5 активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, которые могут быть перспективны для утилизации нефтесодержащих отходов. Изучены культурально-морфологические и таксономические особенности микроорганизмов. На основании результатов изучения культуральных признаков и данных ПЦР-анализа выделенные штаммы были отнесены к таким видам бактерии, как: *Pseudomonas thivervalensis* KMA4.1, *Devosia neptuniae* RMA7, *Glutamicibacter arilaitensis* MMA4, к микромицетам – *Aspergillus flavus* Mach1, *Penicillium chrysogenum* Mach2. Проведен филогенетический анализ изученных штаммов.

**Ключевые слова:** нефть и нефтепродукты, *Pseudomonas thivervalensis* KMA4.1, *Devosia neptuniae* RMA7, *Glutamicibacter arilaitensis* MMA4, *Aspergillus flavus* Mach1, *Penicillium chrysogenum* Mach2.

### Кіріспе

Табиғи ортаның мұнай және мұнай өнімдерімен ластануы, қоршаған ортаға қауіп тудыратын күрделі мәселелердің бірі болып табылады [1, 2].

Мұнай және мұнай өнімдерінің ұзақ мерзімді антропогендік әсері флора мен фаунаының, биоценоз құрамының өзгеруін туғызады [3]. Сонымен бірге, топырақ микрофлорасының функционалдық белсенділігінің толығымен дерлік депрессиясын тудырып, топырақтың физико-химиялық қасиеттері өзгереді [4,5]. Қазіргі таңда табиғи ортаны мұнай және мұнай өнімдерінен тазартудың бірнеше жолдары бар. Алайда, бұл әдістердің көпшілігі қымбат және ластануды толық жоюға алып келмейді [6-9]. Мұнай және мұнай өнімдерінен ластанған табиғи ортаны тазартуда барынша озық әдіс болып – биологиялық әдіс есептеледі [10,11]. Биологиялық (микробиологиялық) әдістерді қолдану, ластанған экожүйелердегі мұнай және мұнай өнімдерінің деградациясының ең тиімді

және ең қауіпсіз әдістердің бірі болып табылады. Биологиялық әдістер микроорганизм-деструкторлардың ферментативті белсенділігіне негізделген [12,13].

Мұнаймен ластанған топырақты тазалау мәселелеріне арналған бірқатар зерттеулер бар. И.Е. Квасников және Т.М. Ключникова зерттеу жұмыстарында мұнай көмірсутектерінің әртүрлі құрамын, әртүрлі топтарға жататын микроорганизмдер ыдырата алатындығы көрсетілген. Бұл топтарға микромицеттер, ашытқылар және бактериялар жатады [14].

Мұнай шламы мен басқа да көмірсутек қосылыстарының суда төмен ерігіштігі олардың биоремедиация кезіндегі күрделі мәселелері болып табылады. Зерттеу жұмыстарында (Bez-za et al., 2015) креозотпен және басқа да көмірсутектермен ластанған топырақтан *CN3* штаммы бөлініп алынып, бұл *Ochrobactrum intermedium* штаммы екені анықталған. Зерттеу жұмысында *Ochrobactrum intermedium* штаммымен утилизациялау нәтижелі екенін көрсетіп, бұл процессті патенттен өткізген [15].



Әдеби деректерге сүйене отырып, мұнаймен ластанған ортада көбінесе *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* туысының өкілдері кездесетін көруге болады [16]. Бүгінгі күнге дейін микроорганизмдердің мұнайдың түрлі көмірсутектерін ыдырата алатындығы туралы көптеген деректер жинақталған [17].

Бұл жұмыстың мақсаты – Оңтүстік Қазақстандағы мұнаймен ластанған топырақты қайта өңдеу мақсатында бөліп алынған көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдерді идентификациялау болып табылады.

### Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу нысаны ретінде мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтан бөліп алынған көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдер изоляттары алынды.

Микроорганизмдердің молекулалық-генетикалық идентификациясы 16S rDNA консервативті локустар бойынша генотиптеу арқылы жүргізілді. Геномдық ДНК-ны бөліп алу өндіруші нұсқаулығы бойынша PureLink Genomic DNA Kit жиынтығының көмегімен бактериялардың тәуліктік дақылдарынан өндіруші нұсқаулығы бойынша жүргізілді.

Бактерия штамдарының молекулалық-генетикалық идентификациясы PureLink Genomic DNA Kit ДНК-ны бөліп алу жиынтығының көмегімен геномдық ДНК бөлініп алынды. Үлгідегі ДНК концентрациясы мен ПТР-өнімді Qubit® 2.0 флуориметрінде Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA) құрылғысының көмегімен анықталды.

16S rRNA гендері фрагменттерін амплификациялау үшін әмбебап праймерлер жұбымен ПТР реакциясы жасалынды: 8F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3') және 806R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3') [22]. Амплификация режимдері 95 °C – 30 сек, 55 °C – 40 сек, 72 °C – 50 сек. және 30 цикл, элонгация 72 °C – та 10 минут аралығында жүргізілді.

ПТР өнімі ультрафиолет транслюминаторында визуализацияланды және 1,2% агарозды геледе бөлінді, жолақтар бромды этидиймен боялды. 1 x TBE – буфері қолданылды. Clean Sweep™ (Thermo Fisher Scientific, АҚШ) реагенті көмегімен птр өнімі тазартылды.

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit жинағын қолдану арқылы бактерияның 16S rRNA гені фрагменттерінің секвенирленуі және BigDye® XTerminator™ Purification Kit жинағы көмегімен секвенирлеу өнімдерін тазалау

өндірушінің хаттамалары бойынша жасалынды. ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, АҚШ) генетикалық анализаторында капиллярлы фореz жүргізілді [23].

Seq A (Applied Biosystems) бағдарламасы бойынша секвенирлеу нәтижелері өңделді. АҚШ биотехнологиялық ақпараттары Ұлттық орталығының Gene Bank Халықаралық қорындағы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) бағдарламасы көмегімен гомологиялық нуклеотидтік бірізділігін анықтау жүзеге асырылды. MEGA 6 бағдарламалық қамтамасыздауды қолдану арқылы филогенетикалық талдау жүргізілді. Clustal W алгоритмін қолдану арқылы нуклеотидтік бірізділікті түзету жасалынды. Филогенетикалық ағашты құрастыру үшін Neighbor-Joining (NJ) «ұқсас туыстарды біріктіру» әдісі қолданылды [24].

Микромицет үлгісінің молекулалық-генетикалық идентификациясы. Жұмыста 3-7 тәуліктік микромицет штамы қолданылды. Мицелийлер -20°C температурада қатырылды. Содан кейін ұнтақ тәрізді күйге дейін 1,5 мл Eppendorff пробиркасында келсаппен үгітілді. Алынған массадан «Plant / Fungi DNA Isolation Kit» компаниясының ДНК-ны өсімдіктерден / микромицеттерден бөліп алатын жиынтықтың көмегімен ДНК бөлініп алынды және бұл жұмыс Norgen Biotek Corp. (Ontario, Canada) өндіруші хаттамасына сәйкес жүргізілді. Үлгідегі ДНК концентрациясы Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Oregon, USA) флуориметрі көмегімен dsDNA HS шкаласы бойынша анықталды. Жұмыста ITS-аймағындағы микромицеттердің әмбебап праймерлері қолданылды: ITS1 (5,-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3,) және (5,-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3,). Амплификациялау үшін реакционды қоспалары: 1,25 мкл Forward праймер (10 мкМ), 1,25 мкл Reverse праймер (10 мкМ), 12,5 мкл Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix 1,5 мкл ДНК және 8,5 судан тұрады [25].

Eppendorf ProS (Hamburg, Germany) амплификаторында птр амплификация режимі жүргізілді: 94 °C – 30 сек; 72 °C – 40 сек, 55 °C – 1 мин; барлығы 30 цикл; 72°C – 10 мин. Clean Sweep™ PCR Purification reagent (Applied Biosystems, USA) реагентімен птр өнімдері тазартылды.

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) қолданумен өндіруші нұсқаулығына сәйкес (Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems АҚШ) секвенирлеу

реакциясы жүргізілді, ары қарай фрагменттер 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) генетикалық анализаторында бөлінді. Seq A (Applied Biosystems, USA) бағдарламасы бойынша секвенирлеу нәтижелері өңделді. *ITS*-аймақтың ДНҚ микромицеттердің алынған нуклеотидтер бірізділігі *BLAST* бағдарламасы көмегімен Gene Bank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) қорындағы мәліметтермен салыстырылды.

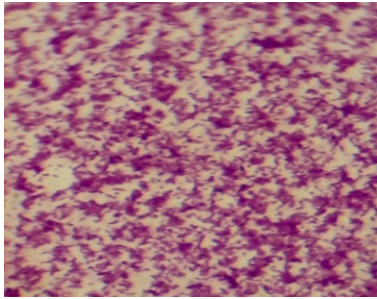
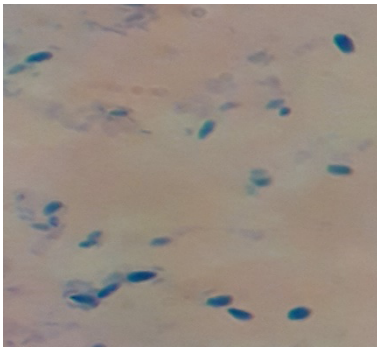
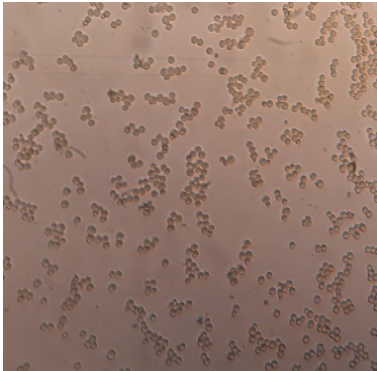
Нәтижелерді статистикалық өңдеу арифметикалық орташа мәнді және стандартты ауытқу мәнін есептеу арқылы жүзеге асырылды. Барлық анықтаулар 3 рет қайталанып жүргізілді. Мәліметтер IBM “Pentium” дербес компьютердің көмегімен “Excel” қолданбалы бағдарламалық пакеттерінің негізінде өңделді.


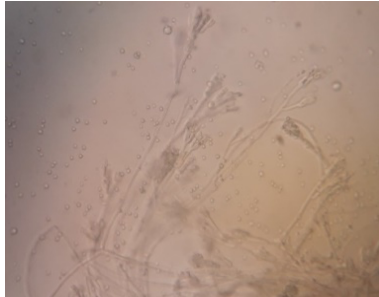
### Зерттеу нәтижелері және талқылау

Оңтүстік Қазақстанның мұнаймен ластанған топырақтарын қайта өңдеу мақсатында мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтан бөліп алынған көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдерге идентификациялау жүргізілді.

Көмірсутегін тотықтырушы микроорганизм изоляттарының микроморфологиясын анықтау үшін БИОМЕД-5, №111050112129 электронды жарық микроскобы арқылы микроскоптау және «Берджи анықтауышын» (1997жыл) қолданылуымен микроорганизм изоляттарының таксономиясы мен культуралды-морфологиялық қасиеттері зерттелініп, нәтижелері 1-кестеде көрсетілді.

1-кесте – Микроорганизмдердің культуралды-морфологиялық сипаттамасы

| Изолят атауы  | Жіктелуі  | Таксономиялық белгілері   | Микроскопиялық суреті (100x ұлғайту)  |
|---------------|---|---|---|
| <i>KMA4.1</i> | <i>Bacteria</i><br><i>Proteobacteria</i><br><i>Gamma proteobacteria</i><br><i>Pseudomonadales</i><br><i>Pseudomonadaceae</i><br><i>Pseudomonas</i><br><i>Pseudomonas thivervalensis</i> | Ет-пептонды қатты қоректік ортада жылтыр, дөңгелек, ақшыл колония түзеді. Аз ғана иілген, басы дөңгелектенген полярлы жіпшелері бар таяқшалар. Аэробтар. Грамтеріс. Амилаза, каталаза, протеиназа үшін белсенді. Оптималды температурасы 25-30 °С.                                |   |
| <i>RMA7</i>   | <i>Bacteria</i><br><i>Proteobacteria</i><br><i>Alphaproteobacteria</i><br><i>Rhizobiales</i><br><i>Hyphomicrobiaceae</i><br><i>Devosia</i><br><i>Devosia neptuniae</i>                  | Колониялары сарғыш түсті, дөңгелек, беті тегіс, жылтыр, диаметрі 7-9мм колониялар. Қысқа таяқша тәрізді, қозғалғыш. Аэробтар. Грамтеріс бактерия. Каталаза, оксидаза, уреаза және бета-галактозидаза үшін белсенді. Оптималды температура 26-28 °С.                               |  |
| <i>MMA4</i>   | <i>Bacteria</i><br><i>Actinobacteria</i><br><i>Actinobacteria</i><br><i>Actinomycetales</i><br><i>Micrococcaceae</i><br><i>Glutamicibacter</i><br><i>Glutamicibacter arilaitensis</i>   | Колониялар дөңгелек, тегіс, дөнес, жұмсақ, ақшыл-сары түсті, колония диаметрі 2мм. Жасуша формасы шар тәрізді, коккалар. Аэробты, қозғалмайтын, спора түзбейтін грамтеріс бактериялар. Гелатиназа, бета-галактозидаза, фосфатаза үшін белсенді. Оптималды температурасы 25-28 °С. |  |

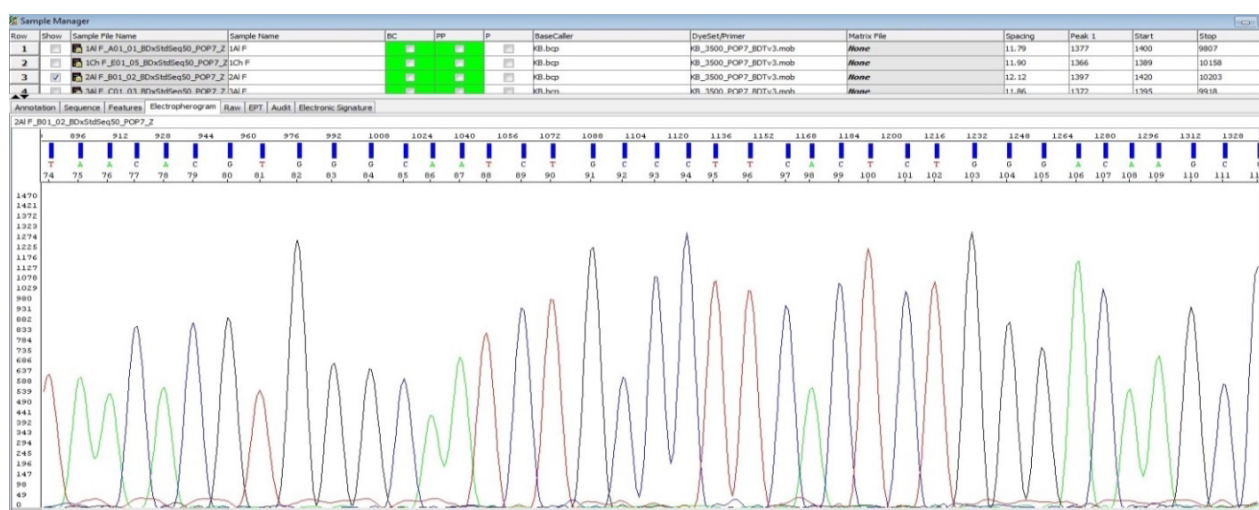
| Изолят атауы | Жіктелуі   | Таксономиялық белгілері   | Микроскопиялық суреті (100x ұлғайту)  |
|--------------|--|---|---|
| <i>Mach1</i> | <i>Fungi.</i><br><i>Ascomycota.</i><br><i>Eurotiomycetes.</i><br><i>Eurotiales.</i><br><i>Trichocomaceae.</i><br><i>Aspergillus.</i><br><i>Aspergillus flavus</i>      | Агарлы Чапека қоректік ортасында колониясы сарғыш жасыл түсті, 7-ші күні колония диаметрі 37мм. Ашық қоңыр түсті экссудат бар. Гифалары бөлшектенген, түссіз. Конидиялды басы радиалды. Конидиялар формасы шартәрізді. Өсуіне оптималды температура 35-37 °С. |  |
| <i>Mach2</i> | <i>Fungi.</i><br><i>Ascomycota.</i><br><i>Eurotiomycetes.</i><br><i>Eurotiales.</i><br><i>Trichocomaceae.</i><br><i>Penicillium.</i><br><i>Penicillium chrysogenum</i> | Қатты Чапека қоректік ортасында колония түсі жасыл, сарғыш пигменті бар, 7-ші күні колония диаметрі 34-35см. Конидиялары үш деңгейлі, метулалары цилиндр тәрізді, конидия эллиптикалық. Гифалары бөлшектенген. Өсуіне оптималды температура 35-38 °С.         |  |

Белсенді 5 изолятқа ПТР-талдауы бойынша идентификациялау жүргізілді. Белсенді көмірсутегін тотықтырушы микроорганизм штамдарының идентификациясын *16S rRNA* гені фрагментінің нуклеотидтік ретін анықтау әдісі арқылы жүргізілді.

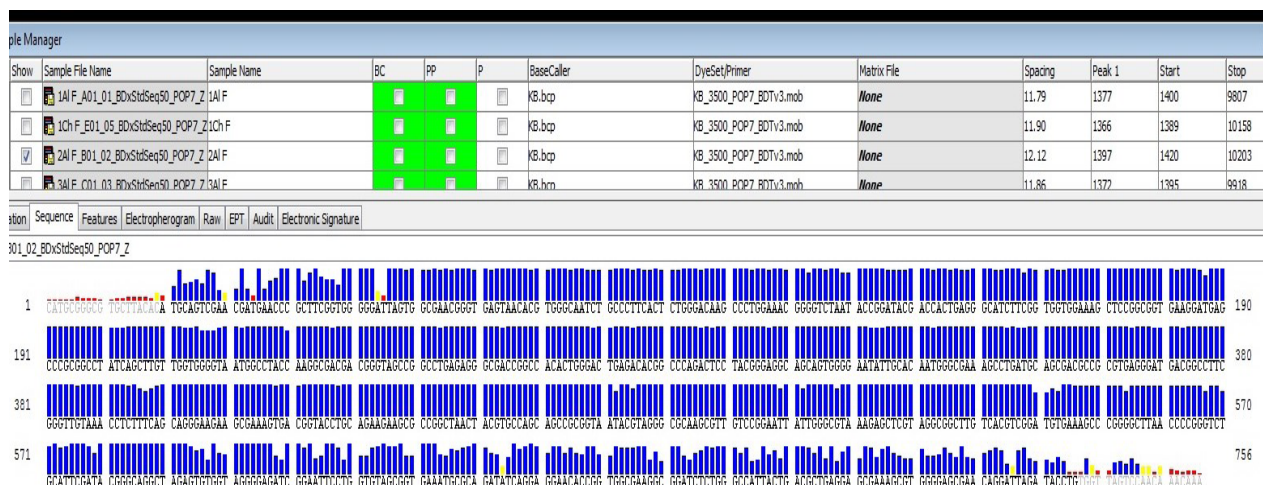
Капиллярлық форездің, үлгілердіңforeграммасы (1-сурет) және секвенирлеу кезіндегі

нуклеотидтердің реттілігінің (2-сурет) зерттеу нәтижелері келтірілді.

Зерттелінген штамдардың *16S rRNA* гені бірізділігінің филогенетикалық талдау нәтижесі Neighbor-Joining генетикалық алшақтықты анықтаудың кластерлік әдісін қолдану арқылы MEGA6 бағдарламасында құрылған филогенетикалық ағаш түрінде көрсетілген.



1-сурет – ABI 3500 құрылғысынан алынған foreграмма үлгілері

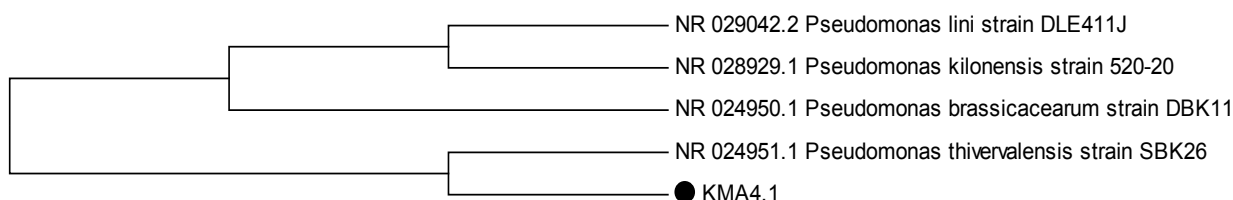


2-сурет – Секвенирлеу кезінде алынған нуклеотидтердің реттілігі

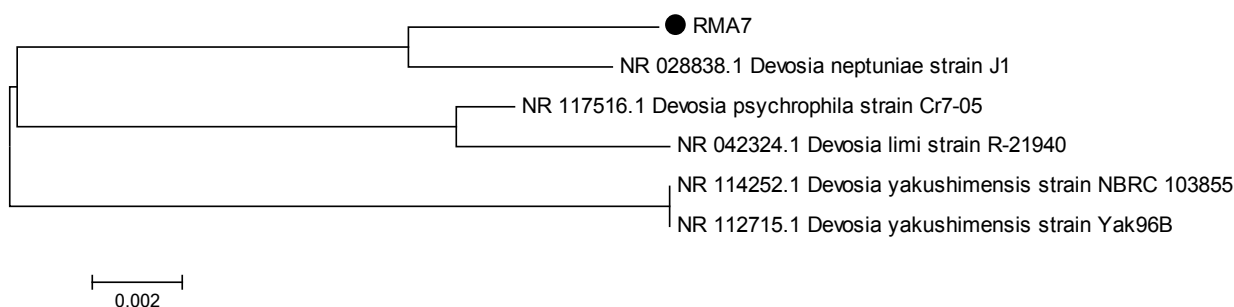
BLAST алгоритмін қолдана отырып, филогенетикалық талдаудың және халықаралық деректер базасында талданатын дәйектіліктің сәйкес келу пайызының нәтижесінде KMA4.1 штамы *Pseudomonas thivervalensis*-ке жататыны анықталып, гомологиялық дәрежесі NR 024951.1 *Pseudomonas thivervalensis* strain SBK 26 штаммен жақындығы 99,4% құрады (3-сурет).

RMA7 штамы *Devosia neptuniae*, гомологиялық дәрежесі 98,62% ең жақын штам NR 028838.1 *Devosia neptuniae* strain J1 екені анықталды (4-сурет).

MMA4 штамы *Glutamicibacter arilaitensis*-ке жататыны анықталды, гомологиялық дәрежесі ең жақын NR 074608.1 *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 штамына 98,83% құрады (5-сурет).

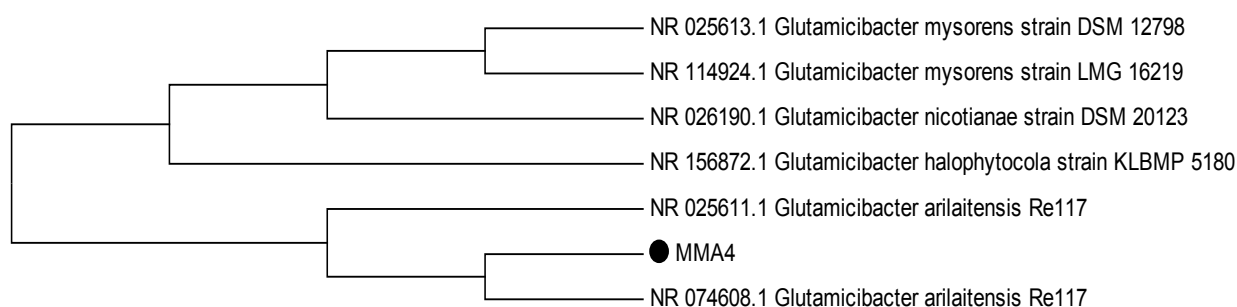


3-сурет – *Pseudomonas thivervalensis* штамының филогенетикалық талдауы

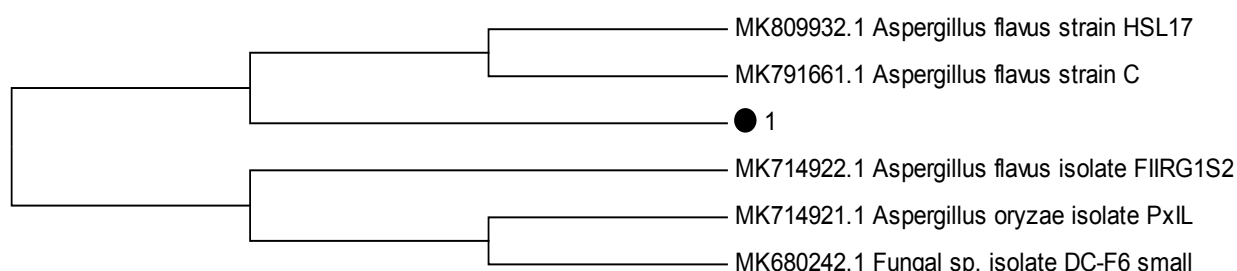


4-сурет – *Devosia neptuniae* штамының филогенетикалық талдауы





5-сурет – *Glutamicibacter arilaitensis* штамының филогенетикалық талдауы



6-сурет – *Aspergillus flavus* филогенетикалық талдауда саңырауқұлақтардың орналасуы



7-сурет – *Penicillium chrysogenum* филогенетикалық талдауында саңырауқұлақтардың орналасуы

Жүргізілген талдаулар нәтижесінде зерттелінетін саңырауқұлақ үлгілерінің ITS – аймағынан нуклеотидтік реттілігі алынған болатын. Алынған мәліметтер NCBI Халықаралық деректер қорының мәліметтерімен салыстырылды. Зерттелген штамдардың таксономиялық идентификациясын жасауға мүмкіндік беретін, ең жақын туыстас штамдармен филогенетикалық талдау құрылды. *Mach1* саңырауқұлақ штамының идентификациясы *Aspergillus flavus* штамына жататындығын көрсетті, мұнда гомологиялық дәрежесі ең жақын MK791661.1 *Aspergillus flavus strain C* және MK809932.1 *Aspergillus flavus strain HSL17* штамдары *Mach1* штамы үшін 100% құрады (6-сурет). *Mach2* штамының таксономиялық идентифи-

кациясы, ең жақын туыстық штам MK088496.1 *Penicillium chrysogenum strain 4S41* екенін көрсетеді. Зерттелуші штамның бұл түрге жатқызуға мүмкіндік беретін гомологиялық дәрежесі 100% құрады (7-сурет).

### Қорытынды

Мұнаймен ластанған топырақтардан бөлініп алынған белсенді көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмнің культуралды-морфологиялық қасиеттері зерттелінді.

Молекулярлы-генетикалық зерттеулер нәтижесінде көмірсутегін тотықтырушы микроорганизм штамдары әртүрлі физиологиялық топтарға жатқызылды:

*Pseudomonas thivervalensis KMA4.1, Devosia neptuniae RMA7, Glutamicibacter arilaitensis MMA4, Aspergillus flavus Mach1, Penicillium chrysogenum Mach2.*

Жүргізілген зерттеулер нәтижелері мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған орталарды қайта өңдеу технологиясында келелді болып табылатын көмірсутегін тотықтырушы микроорганизм штамдары түрге дейін идентификацияланды.

## Мүдделер қақтығысы

Мақаланың құрылымын барлық авторлар оқып, танысты және мүдделер қақтығысы жоқ.

## Алғыс сөз

Мақала авторлары Уалиева Перизат Серикказиевнаға мақала жазу барысында берген құнды кеңестері үшін алғыс білдіреді.

## Әдебиеттер

- 1 Жукова О.В. Формирование консорциума микроорганизмов для очистки сточных вод производств органического синтеза от углеводородов нефти // автореф. канд.дисс: 03.02.08-экология, -Казань, -2012, -С. 3.
- 2 Vacosa H.P., Erdner D.L., Rosenheim B.E., Shetty P, Seitz K.W., Baker B.J., et al. (2018). Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to Light Louisiana sweet crude oil. ISME J. 12, 2532-2543. doi: 10.1038/s41396-018-01901.
- 3 Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, Naidu R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl. Biochim. Biotechnol.* 176, 670-699. doi: 10.1007/s12010-015-1603-5
- 4 Issayeva AU, Uspabayeva AA, Sattarova AM, Shingisbayeva ZA, Isaev RA (2017) Consortium of Hydrocarbon-Oxidizing Microorganisms as a Basis for a Biological Product for Treating Petroleum Industry Waste in Southern Kazakhstan. *Ecology.* -№26(100), -С. 1-10.
- 5 Багдасарова, Ю.А. Обезвреживание нефтезагрязненных грунтов методом биодеструкции – // Экологические проблемы горнопромышленных регионов: Сб. докл. междунар. молодежной конф. – Казань: КНИТУ, -2012. -С. 39-42.
- 6 Бахонина, Е.И. Современные технологии переработки и утилизации углеводородсодержащих отходов. Сообщение 2. Физико-химические, химические, биологические методы утилизации и обезвреживания углеводородсодержащих отходов // Башкирский химический журнал. – 2015. – Т. 22, № 2. – С. 41-49.
- 7 Воеводина, Т.С. Влияние нефти на химические свойства чернозема обыкновенного Южного Предуралья / Т.С. Воеводина, А.М. Русанов, А.В. Васильченко // Вестник ОГУ. – 2015. – № 10(185). – С. 157-161.
- 8 R. J. W. Brooijmans, M. I. Pastink, and R. J. Siezen, “Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew,” *Microbial Biotechnology*, vol. 2, no. 6, -2009, -P. 587–594.
- 9 Волченко, Н.Н. Скрининг углеводородокисляющих бактерий – продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 57-62.
- 10 Гоголева, О.А. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. -2012. -№2. – С. 1-7.
- 11 Джусупова, Д.Б. Биоремедиация объектов окружающей среды углеводородокисляющими микроорганизмами рода *Pseudomonas*: автореф. дисс. д-ра биол. наук: 03.00.07, 03.00.16 / Джусупова Дария Бекайдаровна. – Алматы, -2010, –С. 40.
- 12 Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А. Термотолерантные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв западного Казахстана // Международный конгресс: Биотехнология: состояние и перспективы развития. – Минск, -2019. -С.613-614.
- 13 Курманбаев А.А. Проблемы индикации микроорганизмов, вносимых в почву // Вестник НАН РК. Серия биол.-2002.-№3. –С.29-30.
- 14 Квасников И.Е., Ключникова Т.М. Микроорганизмы-деструкторы нефти и водных бассейнов. –Киев: Наукова думка, 1981. –С. 165.
- 15 Bezza F.A., Evans Chirwa. Petroleum Hydrocarbon Spills in the Environment and Abundance of Microbial Community Capable of Biosurfactant Production // *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology.* -2015. -P. 8-17.
- 16 Медведева А.В. Микробная деградация полициклических ароматических углеводородов // Известия НАН РК. -2013. -№5, -Vol. 299. –С. 98-101.
- 17 Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P., Recent advances in petroleum microbiology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* -2003. –Vol. 67. -№4. -P. 503-549.
- 18 Ганжара Н.Ф., Борисов Б.А., Байбеков Р.Ф. Практикум по почвоведению. -Москва, -2002. -С. 8-13
- 19 Концевая И.И. Микробиология. Практическое пособие. -Гомель, -2012. -С. 18-51.
- 20 Дегтярева, И.А. Методика выделения адаптированных к местным условиям микроорганизмов / И.А. Дегтярева, И.А. Яппаров, А.Я. Хидиятуллина // – Казань, -2011. –С. 24.
- 21 Haschke M., Ahmadian J., Zeidler L., Hubrig T. Procedia Engineerind. In-Situ Recorvery of Critical Technology Elements. “SYMPHOS 2015”, 3<sup>rd</sup> International Symposium on Innovation and Technology in the Phosphate Industry. ---2016, -P. 248-257.

- 22 Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and William, S.T. *Bergey's manual of determinative for bacteriology*. 9th ed. New York: Williams and Wilkins, -1994. –P. 787.
- 23 Wilson N.R. Preparation of genomic DNA from bacteria// *Current Protocols in Molecular Biology*. -1987. –P. 241-245.
- 24 Werle E., Schneider C., Renner M., Volker M., Fihn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* -№ 28. -1994. -P. 4354-4355.
- 25 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*. -Vol. 27. -2006. –P. 397-404.

### References

- 1 Zhukova O.V. Formirovanie konsorciama mikroorganizmov dlya ochistki stochnyh vod proizvodstv organicheskogo sinteza ot uglevodorodov nefiti // avtoref. kand.diss: 03.02.08-ekologiya, -Kazan', -2012, -S. 3.
- 2 Bacosa H.P., Erdner D.L., Rosenheim B.E., Shetty P, Seitz K.W., Baker B.J., et al. (2018). Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to Light Louisiana sweet crude oil. *ISME J.* 12, 2532-2543. doi: 10.1038/s41396-018-01901.
- 3 Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, Naidu R. (2015). A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl. Biochim. Biotechnol.* 176, 670-699. doi: 10.1007/s12010-015-1603-5
- 4 Issayeva AU, Uspabayeva AA, Sattarova AM, Shingisbayeva ZA, Isaev RA (2017) Consortium of Hydrocarbon-Oxidizing Microorganisms as a Basis for a Biological Product for Treating Petroleum Industry Waste in Southern Kazakhstan. *Ecology*. -№26(100), -S. 1-10.
- 5 Bagdasarova, YU.A. Obezvrezhivanie neftezagryaznennyh gruntov metodom biodestrukcii – // *Ekologicheskie problemy gornopromyshlennyh regionov: Sb. dokl. mezhdunar. molodezhnoj konf.* – Kazan': KNITU, -2012 . -S. 39-42.
- 6 Bahonina, E.I. Sovremennye tekhnologii pererabotki i utilizacii uglevodorodsoderzhashchih othodov. Soobshchenie 2. Fiziko-himicheskie, himicheskie, biologicheskie metody utilizacii i obezvrezhivaniya uglevodorodsoderzhashchih othodov // *Bashkirskij himicheskij zhurnal*. – 2015. – T. 22, № 2. – S. 41-49.
- 7 Voevodina, T.S. Vliyanie nefiti na himicheskie svojstva chernozema obyknovennogo YUzhnogo Predural'ya / T.S. Voevodina, A.M. Rusanov, A.V. Vasil'chenko // *Vestnik OGU*. – 2015. – № 10(185). – S. 157-161.
- 8 R. J. W. Brooijmans, M. I. Pastink, and R. J. Siezen, "Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew," *Microbial Biotechnology*, vol. 2, no. 6, -2009, -P. 587–594.
- 9 Volchenko, N.N. Skringing uglevodorodokislyayushchih bakterij – producentov poverhnostno-aktivnyh veshchestv biologicheskoy prirody i ih primenenie v opyte po remediacii neftezagryaznennoj pochvy i nefteshlamma // *Biotekhnologiya*. – 2006. – № 2. – S. 57-62.
- 10 Gogoleva, O.A. Uglevodorodokislyayushchie mikroorganizmy prirodnyh ekosistem // *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN*. -2012. -№2. – S. 1-7.
- 11 Dzhushupova, D.B. Bioremediaciya ob'ektov okruzhayushchej sredy yglevodorodokislyayushchimi mikroorganizmami roda *Pseudomonas*: avtoref. diss. d-ra biol. nauk: 03.00.07, 03.00.16 / Dzhushupova Dariya Bekajdarovna. – Almaty, -2010, –S. 40.
- 12 Ajtkel'dieva S.A., Fajzulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Spankulova G.A. Termotolerantnye kul'tury nefteokislyayushchih mikroorganizmov dlya bioremediacii neftezagryaznennyh pochv zapadnogo Kazahstana // *Mezhdunarodnyj kongress: Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya*. – Minsk, -2019. -S.613-614.
- 13 Kurmanbaev A.A. Problemy indikacii mikroorganizmov, vnosimyh v pochvu // *Vestnik NAN RK. Seriya biol.*-2002.-№3. –S.29-30.
- 14 Kvasnikov I.E., Klyuchnikova T.M. Mikroorganizmy-destruktory nefiti i vodnyh bassejnah. –Kiev: Naukova dumka, 1981. –S. 165.
- 15 Bezza F.A., Evans Chirwa. Petroleum Hydrocarbon Spills in the Environment and Abundance of Microbial Community Capable of Biosurfactant Production // *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. -2015. -P. 8-17.
- 16 Medvedeva A.V. Mikrobnaya degradaciya policiklicheskih aromaticeskikh uglevodorodov // *Izvestiya NANRK*. -2013. -№5, -Vol. 299. –S. 98-101.
- 17 Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P., Recent advances in petroleum microbiology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* -2003. –Vol. 67. -№4. -P. 503-549.
- 18 Ganzhara N.F., Borisov B.A., Bajbekov R.F. Praktikum po pochvovedeniyu. -Moskva, -2002. -S. 8-13
- 19 Koncevaya I.I. Mikrobiologiya. Prakticheskoe posobie. -Gomel', -2012. -S. 18-51.
- 20 Degtyareva, I.A. Metodika vydeleniya adaptirovannyh k mestnym usloviyam mikroorganizmov / I.A. Degtyareva, I.A. Yapparov, A.YA. Hidiyatullina // – Kazan', -2011. –S. 24.
- 21 Haschke M., Ahmadian J., Zeidler L., Hubrig T. *Procedia Engineerind. In-Situ Recorvery of Critical Technology Elements. "SYMPHOS 2015"*, 3rd International Symposium on Innovation and Technology in the Phosphate Industry. ---2016, -R. 248-257.
- 22 Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and William, S.T. *Bergey's manual of determinative for bacteriology*. 9th ed. New York: Williams and Wilkins, -1994. –R. 787.
- 23 Wilson N.R. Preparation of genomic DNA from bacteria// *Current Protocols in Molecular Biology*. -1987. –R. 241-245.
- 24 Werle E., Schneider C., Renner M., Volker M., Fihn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* -№ 28. -1994. -R. 4354-4355.
- 25 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*. -Vol. 27. -2006. –R. 397-404.









3-бөлім  
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

---

Section 3  
**MOLECULAR  
BIOLOGY AND GENETICS**

---

Раздел 3  
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ  
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

М.Д. Амандыкова<sup>1,2\*</sup> , А.М. Тленшиева<sup>1,2</sup> ,  
А.С. Мусаева<sup>2</sup> , Н. Сайто<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

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

<sup>3</sup>Отдел популяционной генетики, Национальный институт генетики, Япония, г. Мисима

\*e-mail: makpal\_30.01@mail.ru

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВЕРБЛЮДОВ АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ГЕНУ *CSN2* МОЛОЧНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ

Верблюжьему молоку придается особое значение из-за его целебных свойств и высокой пищевой ценности. В сравнении с молоком других сельскохозяйственных животных, молоко верблюдов, а также получаемые из него продукты легко усваиваются организмом человека. Таким образом, изучение генетического разнообразия и селекция верблюдов по «предпочтительным» генотипам является важным составляющим верблюдоводства Казахстана.

Белок  $\beta$ -казеин составляет наибольшую часть казеиновой фракции верблюжьего молока, а кодирующий его ген *CSN2* считается основным геном наличия аллелей, связанных с различным уровнем экспрессии казеиновых белков. Транзиция g.2126A>G, расположенная в регионе ТАТА-бокса промотора гена *CSN2*, по предположениям, влияет на активность связывания фактора транскрипции, что в дальнейшем определяет интенсивность экспрессии данного гена. В изученных нами популяциях верблюдов, разводимых в Алматинской области (53 головы), частота аллеля G составила 0,36, тогда как частота аллеля A составила 0,64. Также, выявлено равновесие Харди-Вайнберга, которое было равно 8,589. Уровень полиморфизма был высоким в 1-, 2- и 4-популяциях, составив 100%, тогда как в 3-популяции данный показатель был равен 66,67%. Для изученных популяций были установлены такие статистические показатели, как частота встречаемости генотипов, выявленное и эффективное количество аллелей, разнообразие генов по Nei и др., которые дают популяционно-генетическую характеристику популяций.

**Ключевые слова:** верблюды, верблюжье молоко,  $\beta$ -казеин, PCR-RFLP анализ, SNP, генетическое разнообразие.

M.D. Amandykova<sup>1,2\*</sup>, A.M. Tlenshiyeva<sup>1,2</sup>, A.S. Mussayeva<sup>2</sup>, N. Saitou<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>«Institute of Genetics and Physiology» SC MES RK, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>Division of Population Genetics, National Institute of Genetics, Japan, Mishima

\* e-mail: makpal\_30.01@mail.ru

### Genotyping of camels of Almaty region by *CSN2* dairy productivity gene

Camel milk is especially important for its healing properties and high nutritional value. Compared to milk of other farm animals, camel milk, as well as products obtained from it, are easily absorbed by the human body. Thus, the study of genetic diversity and selection of camels according to “preferred” genotypes is considered as a principal part of camel breeding in Kazakhstan.

The  $\beta$ -casein protein makes up the largest part of the casein fraction of camel milk, and the *CSN2* gene encoding it is considered as the main gene for the presence of alleles associated with different levels of expression of casein proteins. Transition g.2126A>G, located in the TATA box region of the *CSN2* gene promoter, is supposed to affect the activity of binding of the transcription factor, which further determines the expression intensity of this gene. In the populations of camels bred in Almaty region studied by us (53 animals), the frequency of the G allele was 0.36, while the frequency of the A allele was 0.64. Also, the Hardy-Weinberg equilibrium was found to be 8.589. The polymorphism was high in 1-, 2- and 4-populations, amounting to 100%, while in the 3-population this indicator was 66.67%. For the studied populations there were identified such statistical indicators as the genotypes occurrence frequency, the observed and effective number of alleles, gene diversity by Nei etc., which give the population genetic characteristics of populations.

**Key words:** camels, camel milk,  $\beta$ -casein, PCR-RFLP analysis, SNP, genetic diversity.

М.Д. Амандыкова<sup>1,2,\*</sup>, А.М. Тленшиева<sup>1,2</sup>, А.С. Мусаева<sup>2</sup>, Н. Сайто<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>ҚР БҒМ ҒК «Генетика және физиология институты», Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>Популяциялық генетика бөлімі, Ұлттық генетика институты, Жапония, Мисима қ.

\* e-mail: makpal\_30.01@mail.ru

### Алматы облысы түйелерін сүттіліктің CSN2 гені бойынша генотиптеу

Түйе сүтіне оның шипалық қасиеттері мен тағамдық құндылығының жоғары болуына байланысты ерекше мән беріледі. Басқа ауылшаруашылығы жануарларының сүтіне қарағанда, түйе сүті және одан дайындалатын өнімдер адам ағзасына жеңіл сіңіріледі. Осылайша, түйелердің генетикалық әртүрлілігін зерттеу және оларды «жағымды» генотиптер бойынша сұрыптау жұмыстарын жүргізу Қазақстандағы түйе шаруашылығының маңызды құрамдас бөлігі болып табылады.

$\beta$ -казеин белогы түйе сүтінің казеинді фракциясының басым бөлігін құрайды, ал оны кодтайтын CSN2 гені казеин белоктарының экспрессияның әртүрлі деңгейлерімен байланысты болатын аллельдердің болу-болмауының негізгі гені болып саналады. g.2126A>G транзисиясы CSN2 генінің промоторының ТАТА-бокс аймағында орналасқан және болжам бойынша, осы геннің экспрессиясының қарқындылығын анықтайтын транскрипция факторының байланысу белсенділігіне әсер етеді. Зерттеуге алынған Алматы облысында өсірілетін түйелер популяцияларында (53 бас) G аллелінің жиілігі 0,36 көрсеткішіне ие болды, ал А аллелінің жиілігі 0,64 құрады. Сонымен қатар, Харди-Вайнберг тепе-теңдігі анықталды және оның мәні 8,589 тең болды. Полиморфизм деңгейі 1-, 2- және 4-популяцияларда жоғары болып 100% құраса, 3-популяцияда бұл көрсеткіш 66,67% тең болды. Зерттелген популяцияларда генотиптердің кездесу жиілігі, анықталған және эффективті аллельдер саны, Nei бойынша гендердің әртүрлілігі және т.б. статистикалық көрсеткіштер анықталды. Бұл көрсеткіштер популяцияларға популяциялық-генетикалық сипаттама береді.

**Түйін сөздер:** түйелер, түйе сүті,  $\beta$ -казеин, PCR-RFLP анализ, SNP, генетикалық әртүрлілік.

## Введение

Среди ведущих в мире производителей верблюжьего молока Казахстан занимает лидирующие позиции. В настоящее время поголовье верблюдов в Республике Казахстан составляет 243,2 тыс. голов, увеличившись на 4,1% за 2019-2020 годы [1]. Наиболее острой проблемой верблюдоводства сегодня является повышение продуктивности и племенных качеств животных, а именно, направленное развитие молочного верблюдоводства, которое обусловлено быстрорастущим спросом на верблюжье молоко над фактической возможностью его производства. К основным проблемам, препятствующим увеличению производства верблюжьего молока, которое удовлетворило бы потребности рынков Казахстана и зарубежных стран можно отнести: незначительную молочную продуктивность верблюдов, небольшую численность поголовья направленного молочного типа казахских бактрианов, дромедаров, а также, их гибридов в соотношении с общим поголовьем популяций верблюдов Казахстана. Однако, стоит отметить, что жирность верблюжьего молока, производимого в Республике Казахстан, очень высокая (4,0% и выше) по сравнению с молоком производимым в

других верблюдоразводящих странах (3,2-3,5%). И связано это с тем, что молоко, получаемое от отечественных пород верблюдов, а именно, казахских бактрианов, обладает жирностью 5,0-6,0%, у туркменских одnogорбых верблюдов этот показатель равен 3,2-3,5%, а у гибридов бактриана и дромедара 3,8-5,0%. Верблюжье молоко с таким высоким процентом жирности используется для производства казахской национальной молочной продукции – шубат и кымыран, которые не имеют аналогов в мировой индустрии молочной продуктивности [2].

Казахстанские породы верблюдов, также, отличаются биологическим разнообразием своего генофонда, в сравнении с большинством стран Центральной Азии. Тем не менее, в последнее время наблюдаются некие изменения в породно-популяционном аспекте, которые указывают на генетическую утрату разнообразия верблюдов. Из чего следует, что для сохранения биологического разнообразия верблюдов в стране необходимо провести ряд мер по оценке состояния верблюдоводства в стране, реализовать опись скота, проводить работы по сохранению природных и полученных благодаря возможностям селекции популяций чистопородных верблюдов и их гибридов, при этом учитывая происходящие про-

цессы природного и антропогенного происхождения. Таким образом, особенностью селекционно-генетической работы в верблюдоводстве Казахстана должно являться применение направленных селекционных работ по увеличению поголовья животных с желаемым генотипом, ввиду доступности современных методов [2].

Верблюжье молоко отличается своим специфическим солоноватым вкусом, богат макро и микроэлементами, сочетание аминокислот, содержащихся в нем, считается идеальным для организма человека, что делает его наиболее близким к молоку человека. Считается, что верблюжье молоко обладает лечебными свойствами по отношению к таким заболеваниям, как гепатит С, болезнь Альцгеймера и др., благодаря содержанию в нем антител. Также, имеются исследования направленные на определение роли верблюжьего молока в сокращении симптомов диабета и ряда сердечных заболеваний. В сравнении с молоком крупного рогатого скота, содержание витамина С и содержание железа в молоке верблюдов в несколько раз выше [2].

Схожесть верблюжьего молока с человеческим также объясняется его уникальным составом, в котором более высокую концентрацию составляет  $\beta$ -казеин (65%) и более низкую  $\kappa$ -казеин (3,5%),  $\alpha$ 1-казеин (22 %), и  $\alpha$ 2-казеин (9,5%) [3]. Из 4 генов кодирующих данные белки, полиморфизм был изучен у *CSN2*, *CSN3* и *CSN1S1*. SNP g.2126A>G в гене *CSN2* и g.1029T>C в гене *CSN3* играют важную роль в изменении консенсусных последовательностей факторов транскрипции (TATA-*box* и HNF-1, соответственно) [4, 5]. Напротив, для гена *CSN1S2* имеется противоречивая информация о количестве экзонов, и до сих пор не сообщалось о *SNP* для  $\alpha$ 2-казеина, несмотря на то, что ряд альтернативных вариантов сплайсинга был уже описан [6]. Однако, в этом отношении полезные данные могут быть получены из анализа генома, сборка которого доступна онлайн для одичавших, двугорбых и одногорбых верблюдов, а также для альпаки. Полная последовательность генома состоит из примерно 2000 *Mbase* для каждого вида, но изолированные геномные последовательности все еще не размещены в общедоступных базах данных и их аннотация почти полностью отсутствует [7]. Это наблюдение подчеркивает необходимость сбора дополнительных данных для аннотации генома верблюда. Кроме того, учитывая тесную связь между генами казеина, оценку взаимосвязи между вариантами казеина и характеристиками молочной продуктивности

можно улучшить, рассматривая гаплотипы казеина вместо отдельных генов [8].

Сообщается, что на распределение кальция и стабильность мицелл казеина влияют разные уровни фосфорилирования  $\beta$ -казеина, поэтому данный белок является важным компонентом верблюжьего молока, играя ключевую роль в определении его питательных и технологических свойств [9]. У верблюдов ген  $\beta$ -казеина (*CSN2*) состоит из 9 экзонов и 7819 нуклеотидов [4]. Несколько исследований у жвачных животных показали связь полиморфизма гена  $\beta$ -казеина с важными с экономической точки зрения характеристиками, такими как удои и состав молока крупного рогатого скота, овец и др. [10, 11]. Ранее, *Pauciullo* с соавторами [4] изучил транзицию g.2126A>G в промоторной области *CSN2* у четырех популяций суданских одногорбых верблюдов. Этот *SNP* 2126A/G расположен на три нуклеотида ниже TATA-*box* и может влиять на связывание РНК-полимеразы к TATA-*box*у, подвергая к изменению экспрессию гена [12].

Фракция  $\beta$ -казеина была глубоко изучена у жвачных животных и хорошо охарактеризована как на уровне белка, так и на уровне ДНК. Многие аллели, связанные с разной скоростью синтеза белка, были идентифицированы в соответствующем кодирующем гене (*CSN2*). Сообщалось о по меньшей мере 6 генетических вариантах у овец [13], тогда как по меньшей мере 8 аллелей, соответствующих 7 вариантам  $\beta$ -CN, были идентифицированы у коз [14] и по крайней мере 17 аллелей, соответствующих 12 вариантам  $\beta$ -CN, были идентифицированы у крупного рогатого скота [15, 16, 17]. У верблюдов же  $\beta$ -казеин был подробно охарактеризован на белковом уровне, генетические варианты гена  $\beta$ -казеина были изучены у зарубежных популяций верблюдов [4], тогда как подобная генетическая характеристика отсутствует для популяций казахстанских верблюдов.

В проведенных нами ранее работах по изучению генов молочной продуктивности мы описали 4 популяции верблюдов, разводимых в Алматинской области по гену *CSN3*  $\kappa$ -казеина верблюжьего молока, где дали характеристику относительно распределению желаемого генотипа по этому гену [18]. В данной статье изучена частота распределения генотипов по гену  $\beta$ -казеина *CSN2* и проведен статистический анализ, где определены частота встречаемости генотипов, выявленное и эффективное количество аллелей, разнообразие генов по *Nei* и др.

## Материалы и методы

**Сбор материалов.** Для исследования были собраны образцы крови у 53 отобранных голов из 4 популяций верблюдов, разводимых в Алматинской области. Образцы были собраны в вакуумные ЭДТА пробирки для предотвращения свертывания крови и транспортированы в лабораторию в специальных охлаждающих контейнерах (4°C–8°C). Образцы хранились в морозильной камере до использования для выделения ДНК.

**Выделение геномной ДНК.** Выделение геномной ДНК из образцов крови было проведено с использованием набора для экстракции ДНК из крови и тканей «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия), по рекомендованной производителем методике. Выделенные образцы ДНК хранились в морозильнике при температуре -20°C [19].

**Определение качества и концентрации ДНК.** Для определения качества и концентрации ДНК были использованы ДНК-фотометр (*Biofotometer Plus*, Eppendorf, Германия) и метод агарозного гель-электрофореза [20]. Изучение качества ДНК и проверка на присутствие РНК проводилось в 0,8% агарозном гель-электрофорезе. Визуализация молекул ДНК проводилась с помощью геледокументирующей системы (*Quantum-ST5-1100 Vilber Lourmat*, Франция).

**PCR-RFLP-анализ.** Амплификация гена *CSN2*, длина которого составляет 659 п.н., с целью определения g.2126A/G SNP проводилась с использованием *Mastercycler* (Eppendorf, Thermo Fisher Scientific, США) в следующих условиях: 95°C (4 мин), 35 циклов при 95°C (60 с), отжиг при 53°C (45 с), 72°C (90 с) и 72°C (10 мин). Типичная смесь для реакции ПЦР (20 µl) состояла из *PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, США) и следующей парой праймеров, синтезированных на базе «Института генетики и физиологии»: смысловой праймер 5'-GTT TCT CCA TTA CAG CAT C-3' и антисмысловой праймер 5'-TCA AAT STA TAC AGG CAC TT-3'. Продукты ПЦР проверялись в 1,5% агарозном гель-электрофорезе, для окрашивания использовался бромистый этидий [20]. Далее образцы продуктов ПЦР были использованы для генотипирования животных по g.2126A>G SNP методом *PCR-RFLP*. Рестрикция ПЦР продукта была проведена с использованием эндонуклеазы *HphI* (5'...GGT-GAN<sub>8</sub>↓...3') (ThermoScientific, США) при температуре 37°C. Смесь для рестрикции состояла из 5µl ПЦР продукта, 9µl dH<sub>2</sub>O, 1,25µl 10×*Buffer B* и 0,75µl рестрикционной эндонуклеазы *HphI*. Продукты рестрикции были проанализированы

с использованием 5% полиакриламидного гель-электрофореза при окрашивании красителем *SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain* (ThermoScientific, США) в 1×TBE буфере. Визуализация результатов проводилась с помощью геледокументирующего оборудования (*Quantum-ST5-1100 Vilber Lourmat*, Франция). Во всех исследованных популяциях были рассчитаны частота аллелей и равновесие Харди-Вайнберга ( $\chi^2$ ). При проведении статистических расчетов для установления таких показателей, как частота встречаемости генотипов, разнообразие генов по *Nei*, выявленное и эффективное количество аллелей и др. была использована программа *POPGENE Software*.

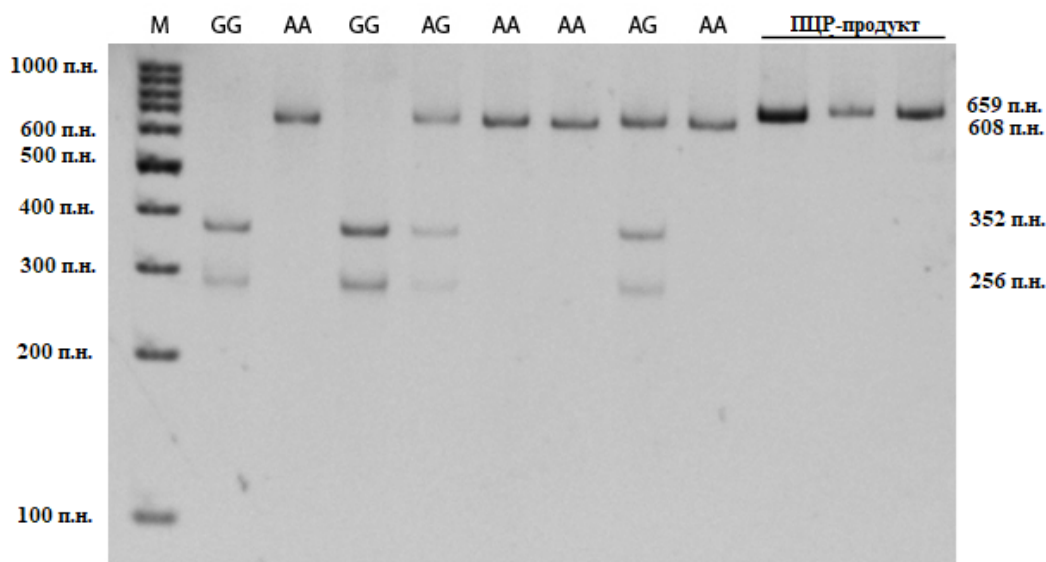
## Результаты и их обсуждение

Производство высококачественного молока и переработанных молочных продуктов является важным шагом на пути к успеху развития молочного верблюдоводства [21]. Это исследование было направлено на выявление полиморфизма гена *CSN2* у 4 популяций верблюдов Алматинской области. Результаты анализа *PCR-RFLP* показали наличие трех различных паттернов рестрикции у исследованных животных. Рестрикция продукта ПЦР размером 659 п.н. ферментом *HphI* привело к получению двух фрагментов размером 608 и 51 п.н. для образцов А/А, тогда как фрагмент 608 п.н. дополнительно был разделен на два фрагмента размером 352 и 256 п.н. в случае образцов G/G. Паттерн рестрикции гетерозиготных образцов А/G показал четыре фрагмента (608, 352, 256 и 51 п.н.). На рисунке 1 видно, что в изученных нами популяциях выявлены все 3 генотипа гена *CSN2*: генотип GG был выявлен по фрагментам длиной в 352 п.н., 256 п.н. и 51 п.н.; генотип AA – 608 п.н. и 51 п.н.; гетерозиготный генотип AG – 608, 352, 256 и 51 п.н. Фрагмент длиной в 51 п.н. присутствует во всех трех генотипах, но слабо визуализируется на рисунке из-за очень короткой длины.

По полученным нами результатам исследования можно заметить, что в 4 популяциях верблюдов, разводимых в Алматинской области генотипы по изучаемому гену *CSN2* встречаются неравномерно. Среди 53 протестированных верблюдов генотип А/А встречался с самой высокой частотой – 52,8%, в то время как генотипы G/G и А/G встречались с частотой 24,6% и 22,6%, соответственно (таблица 1). Эти результаты значительно отличаются от данных выявленных *Pauciullo* и его соавторов, которые иден-

тифицировали вышеуказанные генотипы *CSN2* – A/G (51%), A/A (40%) и G/G (9%) – в четырех популяциях суданских верблюдов (Шанбали, Кали, Лахаой и Араби) методом *PCR-RFLP* [4]. По этим данным можно заметить, что по срав-

нению с популяциями суданских верблюдов, в изученных нами популяциях преобладает генотип A/A (52,8%), затем генотип G/G (24,6%), гетерозиготный же генотип имеет наименьшую частоту распределения (A/G).



**Рисунок 1** – Генотипирование верблюдов Алматинской области по гену *CSN2* g.2126A>G рестриктазой *HphI* ПЦР-ПДРФ методом. М – молекулярный маркер (*ThermoScientific*, США). Описание в тексте.

**Таблица 1** – Распределение генотипов по гену *CSN2* и частота аллелей в популяциях верблюдов Алматинской области

| Популяции верблюдов   | Выявленные генотипы |    |    |       | Частота аллелей, % |      |
|-----------------------|---------------------|----|----|-------|--------------------|------|
|                       | AA                  | AG | GG | Всего | A                  | G    |
| 1                     | 5                   | 2  | 1  | 8     | 0,75               | 0,25 |
| 2                     | 4                   | 2  | 3  | 9     | 0,6                | 0,4  |
| 3                     | 18                  | 2  | 0  | 20    | 0,95               | 0,05 |
| 4                     | 1                   | 6  | 9  | 16    | 0,25               | 0,75 |
| Всего                 | 28                  | 12 | 13 | 53    | 0,64               | 0,36 |
| $\chi^2 = 8,589 - pJ$ |                     |    |    |       |                    |      |

Что касается отдельных аллелей, показатели частоты аллеля A варьировались от 0,25 до 0,95, показав наивысшее значение в первой популяции и наименьшее в четвертой. Частота встречаемости аллеля G в изученных популяциях колебалась от 0,05 (в третьей популяции) до 0,75 (в четвертой популяции).

Важно отметить, что в первых трех популяциях преобладает генотип A/A, тогда как в 4-популяции больше всего встречается противополож-

ный генотип G/G, что показывает генетическое отличие 4-популяции от других по изучаемому гену. Второй наиболее часто встречающийся генотип в этой же популяции – это гетерозиготный генотип A/G, что также отличает его от других популяций. У животных из 3-популяции гомозиготный генотип G/G вовсе отсутствовал, а гетерозиготный генотип A/G встречался только у 2 из 18 изученных животных, что говорит о низком уровне аллеля G в данной популяции

(0,05). Из этого следует, что данная популяция нуждается в направленной селекционной работе по увеличению аллеля G, для увеличения желательного генотипа A/G и сохранения генетического разнообразия популяции. Напротив, по тем же причинам 4-популяция нуждается в увеличении аллеля A.

Равновесие Харди-Вайнберга по всем 4 популяциям составило 8,589. Стоит отметить, что

на этот показатель могли повлиять ряд таких факторов, как недостаточное количество выборки, ограниченность системы спаривания, т.д. или др.

Как показал статистический анализ, уровень полиморфизма был высоким в 1-, 2- и 4-популяциях составив 100%, тогда как в 3-популяции данный показатель был равен 66,67% (таблица 2).

**Таблица 2** – Анализ генетического разнообразия 4 популяций верблюдов на основе изучения полиморфизма гена *CSN2*

| Популяции верблюдов | Количество животных | Генотип          | Na            | Ne            | h             | I             |
|---------------------|---------------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 1                   | 8                   | AA               | 2.0000        | 1.9038        | 0.4747        | 0.6677        |
|                     |                     | AG               | 2.0000        | 1.3022        | 0.2321        | 0.3939        |
|                     |                     | GG               | 2.0000        | 1.1374        | 0.1208        | 0.2394        |
|                     |                     | Среднее значение | 2.0000        | 1.4478±0.4337 | 0.2759±0.1810 | 0.4034±0.2169 |
| 2                   | 9                   | AA               | 2.0000        | 1.6119        | 0.3796        | 0.5674        |
|                     |                     | AG               | 2.0000        | 1.2631        | 0.2083        | 0.3631        |
|                     |                     | GG               | 2.0000        | 1.4279        | 0.2997        | 0.4767        |
|                     |                     | Среднее значение | 2.0000        | 1.4343±0.1745 | 0.2958±0.0857 | 0.4690±0.1024 |
| 3                   | 20                  | AA               | 2.0000        | 1.7620        | 0.4325        | 0.6240        |
|                     |                     | AG               | 2.0000        | 1.1079        | 0.0974        | 0.2024        |
|                     |                     | GG               | 1.0000        | 1.0000        | 0.0000        | 0.0000        |
|                     |                     | Среднее значение | 1.6667±0.5774 | 1.2899±0.4123 | 0.1766±0.2269 | 0.2755±0.3184 |
| 4                   | 16                  | AA               | 2.0000        | 1.0655        | 0.0615        | 0.1408        |
|                     |                     | AG               | 2.0000        | 1.4951        | 0.3311        | 0.5132        |
|                     |                     | GG               | 2.0000        | 1.8112        | 0.4479        | 0.6401        |
|                     |                     | Среднее значение | 2.0000        | 1.4573±0.3743 | 0.2802±0.1982 | 0.4314±0.2595 |

\* Na – наблюдаемое количество аллелей

Ne – Эффективное количество аллелей [22]

h – Разнообразие генов по Nei [23]

I – Информационный индекс Шеннона [24]

Гетерозиготность считается наиболее популярным критерием оценки генетической изменчивости в популяции. Эффективное число аллелей считается мерой генетического разнообразия как отдельных видов, так и популяций, представляя собой функцию от доли полиморфных локусов, числа аллелей на локус и выравнивания частот аллелей. Мера, обратная гомозиготности оценивается эффективным числом аллелей. При одинаковой ча-

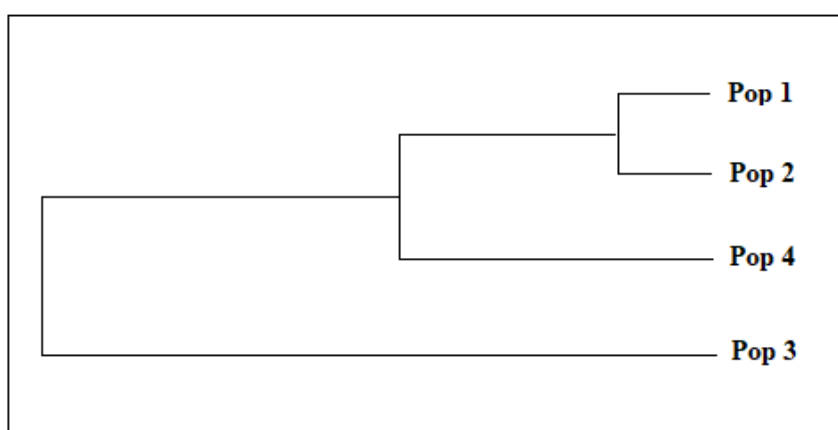
стоте этих аллелей в популяции гетерозиготность будет в равной мере с фактической [25]. Среднее значение наблюдаемого количества аллелей (Na), которое показывает фактическое количество аллелей обнаруженное в изучаемых популяциях, было одинаковым (2.0000) во всех изученных нами популяциях по всем генотипам, показав отличие только в третьей популяции (1.6667±0.5774) из-за низкого показателя генотипа GG.



Средний показатель эффективного количества аллелей ( $N_e$ ) был наивысшим в 1-популяции ( $1.4478 \pm 0.4337$ ) и наименьшим в третьей ( $1.2899 \pm 0.4123$ ). Этот показатель описывает количество аллелей с одинаковой частотой, которое потребуется для достижения той же ожидаемой гетерозиготности, что и в исследуемой популяции. Что касается разнообразия генов, этот показатель имел почти одинаковое значение в 1-, 2- и 4-популяциях, с максимальным значением ( $0.2958 \pm 0.0857$ ) во второй популяции и минимальным ( $0.1766 \pm 0.2269$ ) в третьей. Индекс Шеннона, который показывает меру

разнообразия генов, также был наиболее высоким во второй популяции ( $0.4690 \pm 0.1024$ ) и наименьшим в третьей ( $0.2755 \pm 0.3184$ ).

Далее нами было составлено филогенетическое дерево для оценки родственной близости популяций по разнообразию гена молочной продуктивности *CSN2* (Рисунок 2). По нему можно увидеть, что наиболее близкородственными являются популяции 1 и 2, далее они имеют сходство с популяцией 4, тогда как популяция 3 находится на самой отдаленной от всех популяций ветке филогенетического дерева.



**Рисунок 2** – Филогенетическое дерево, построенное на основе стандартной генетической дистанции  $N_{ei}$  между четырьмя популяциями верблюдов

Измерение генетических изменений определяется двумя параметрами: генетическая идентичность ( $I$ ), которая оценивает долю генов, которые идентичны в двух популяциях, и генетическое расстояние ( $D$ ), которое оценивает долю изменений генов, которые произошли в ходе эволюции двух популяций. Значение  $I$  может иметь размах от 0 до 1, что соответствует экстремальным ситуациям, в которых ни один или все гены не идентичны, соответственно; значение  $D$  может

находиться в диапазоне от нуля до бесконечности.  $D$  может превышать 1, потому что каждый ген может изменяться более одного раза в одной или обеих популяциях, поскольку эволюция продолжается в течение многих поколений [26]. Для проверки достоверности построенного нами филогенетического дерева были использованы данные расчетов генетической идентичности и генетической дистанции между популяциями, представленные ниже в таблице (таблица 3).

**Таблица 3** – Оригинальные меры генетической идентичности и генетической дистанции по  $N_{ei}$  [21]. Генетическая идентичность (вверху по диагонали) и генетическая дистанция (под диагональю).

| Популяция | 1      | 2      | 3      | 4      |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| 1         | ****   | 0.9851 | 0.9595 | 0.9042 |
| 2         | 0.0150 | ****   | 0.9058 | 0.9616 |
| 3         | 0.0414 | 0.0990 | ****   | 0.7577 |
| 4         | 0.1007 | 0.0391 | 0.2774 | ****   |

К примеру, генетическая идентичность 1- и 2- популяций равна 0,9851, а генетическая дистанция равна 0,015, что доказывает их близкородственную связь, показанную в филогенетическом дереве. Далее, наиболее родственными являются 2- и 4-популяция с генетической идентичностью 0,9616; затем 1- и 3- с генетической идентичностью 0,9595. Генетическая идентичность 1- и 4-, а также 2- и 3-популяций имеют примерно одинаковое значение (0,9042 и 0,9058). Напротив, самыми отдаленными друг от друга популяциями являются 3- и 4-популяции, так как генетическая идентичность этих популяций равна 0,7577, а генетическая дистанция составляет 0,2774.

### Заключение

Выявление генетического полиморфизма по генам молочной продуктивности верблюдов является наиболее полезным методом направленной селекции для улучшения количе-

ственных и качественных показателей молока. Полученные нами данные могут быть использованы для описания генетического потенциала изученных популяций по гену молочной продуктивности *CSN2*. Результаты дают возможность предоставить рекомендации верблюдоводческим хозяйствам по проведению дальнейших селекционных работ внутри популяций. Также, эти данные могут послужить полезным материалом для изучения генетического разнообразия других популяций верблюдов по гену *CSN2*. Дальнейшие работы будут направлены на изучение полиморфизма гена *CSN1S1*, кодирующего белок казеин- $\alpha$ -s1, на проведение сравнительного анализа и характеристики 4 популяций по всем изученным нами генам белков казеина.

### Конфликт интересов

Все авторы ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов

### Литература

- 1 [https://forbes.kz/news/2020/06/12/newsid\\_227295](https://forbes.kz/news/2020/06/12/newsid_227295). В Казахстане увеличилось поголовье скота.
- 2 <https://www.kazportal.kz/verblyudovodstvo-v-kazahstane/>. Верблюдоводство в Казахстане.
- 3 Berhe T., Seifu E., Ipsen R., Kurtu M.Y., Hansen, E.B. Processing challenges and opportunities of camel dairy products // *Int. J. Food Sci.* – 2017. – Vol. 2. – P. 1–8.
- 4 Pauciuolo A., Giambra I., Iannuzzi L., Erhardt G. The  $\beta$ -casein in camels: molecular characterization of the *CSN2* gene, promoter analysis and genetic variability // *Gene.* – 2014. – Vol. 547. – P. 159–168.
- 5 Pauciuolo A., Shuiep E.S., Cosenza G., Ramunno L., Erhardt G. Molecular characterization and genetic variability at  $\beta$ -casein gene (*CSN3*) in camels // *Gene.* – 2013. – Vol. 513. – P. 22–30.
- 6 Ryskaliyeva A., Henry C., Miranda G., Faye B., Konuspayeva G., Martin P. Alternative splicing events expand molecular diversity of camel *CSN1S2* increasing its ability to generate potentially bioactive peptides // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 5243.
- 7 Avila F., Baily M.P., Perelman P., Das P.J., Pontius J., Chowdhary R. et al. A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*) // *Cytogenet. Genome Res.* – 2014a. – Vol. 144. – P. 196–207.
- 8 Pauciuolo A., Shuiep E.T., Ogah M.D., Cosenza G., Di Stasio L., Erhardt G. Casein Gene Cluster in Camelids: Comparative Genome Analysis and New Findings on Haplotype Variability and Physical Mapping // *Front. Genet.* – 2019. – Vol. 10. – No 748.
- 9 Amigo L., Recio I., Ramos M. Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review // *Int. Dairy J.* – 2000. – Vol. 10. – P. 135–149.
- 10 Soyudal B., Ardicli S., Samli H., Dincel D., Balci F. Association of polymorphisms in the *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and *LALBA* genes with milk production traits in Holstein cows raised in Turkey // *J. Hellenic Vet. Med. Soc.* – 2018. – Vol. 69. – P. 1271–1282.
- 11 Corral J., Padilla J., Izquierdo M. Associations between milk protein genetic polymorphisms and milk production traits in Merino sheep breed // *Livest. Sci.* – 2010. – V. 129. – P. 73–79.
- 12 Lee S.M., Kim H.M., Moon S.J., Kang M.J. Cloning and molecular characterization of porcine  $\beta$ -casein gene (*CNS2*) // *Asian-Austral. J. Anim.* – 2012. – V. 25. – P. 421–427.
- 13 Chessa S., Rignanese D., Berbenni M., Ceriotti G., Martini M., Pagnacco G., Caroli A. New genetic polymorphisms within ovine  $\beta$ - and  $\alpha$ 2-caseins // *Small Ruminant Res.* – 2010. – Vol. 88. – P. 84–88.
- 14 Cosenza G., Pauciuolo A., Colimoro L., Mancusi A., Rando A., Di Bernardino D., Ramunno L. An SNP in the goat *CSN2* promoter region is associated with the absence of  $\beta$ -casein in milk // *Anim. Genet.* – 2007. – Vol. 38. – P. 655–658.
- 15 Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition // *J. Dairy Sci.* – 2009. – Vol. 92. – P. 5335–5352.
- 16 Suteu M., Vlaic A., Daraban S.V. Characterization of a novel porcine *CSN2* polymorphism and its distribution in five European breeds // *Animals.* – 2019. – Vol. 9. – No 7. – P. 419.

- 17 Novier A.M., Ramadan Sh. I. Association of  $\beta$ -casein gene polymorphism with milk composition traits of Egyptian Maghrebi camels (*Camelus dromedarius*) // Arch. Anim. Breed. – 2020. – Vol. 63. – P. 493–500.
- 18 Амандыкова М.Д., Досыбаев К.Ж., Байбагысов А.М., Литус И.А., Икласов М.К., Мусаева А.С., Бекманов Б.О., Сайто Н. Частота распределения гена *CSN3* у верблюдов Алматинской области // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2019. – Т. 81, № 4. – С. 34-42.
- 19 <https://docplayer.ru/63720103-Instrukciya-dnk-sorb-s-m.html>. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из биологического материала ДНК-сорб-С-М.
- 20 Бекманов Б.О., Амиргалиева А.С., Мусаева А.С., Оразымбетова З.С., Досыбаев К.Ж., Хусаинова Э.М., Жапбасов Р.Ж., Жомартов А.М., Тулекей М.Д. Молекулярно-генетический анализ овец Едилбайской породы // Известия НАН РК. – 2015. № 3. – С. 28-33.
- 21 Nagy P., Fabri Zs.N., Varga L., Reiczigel J., Juhasz, J. Effect of genetic and nongenetic factors on chemical composition of individual milk samples from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) under intensive management // J. Dairy Sci. – 2017. – V. 100. – P. 8680–8693.
- 22 Motoo Kimura, James F. Crow The number of alleles that can be maintained in a finite population // Genetics. – 1964. – Vol. 49, No 4. – P. 725-738.
- 23 Masatoshi Nei Analysis of gene diversity in subdivided populations // PNAS. – 1973. – V. 70. – No 12., P. 3321-3323.
- 24 Lewontin R.C. The Apportionment of Human Diversity. In: Dobzhansky T., Hecht M.K., Steere W.C. (eds) // Evolutionary Biology. Springer. – 1972.
- 25 Сметенов И.Т., Акишев Ж.Д., Алтыбаева Н.А., Мухитдинов Н.М., Бисенбаев А.К. Оценка генетического полиморфизма популяции *Berberis iliensis* Или-Балхашского региона на основе ISSR-маркеров // Доклады Национальной Академии наук Республики Казахстан. – 2012. – № 4. – С. 49-57.
- 26 <https://www.britannica.com/science/evolution-scientific-theory/Genetic-differentiation-during-speciation#ref311720>. Genetic differentiation during speciation.

#### References

- 1 Amandykova M.D., Dossybayev K.Zh., Baibagysov A.M., Litus I.A., Iklasov M.K., Mussayeva A.S., Bekmanov B.O., Saitou N. (2019) Chastota raspredeleniya gena *CSN3* u verbluydov Almatinskoy oblasti [CSN3 gene distribution frequency in camels of Almaty region]. Вестник КазНУ. Серия биологическая, vol. 81, no 4, pp. 34-42.
- 2 Amigo L., Recio I., Ramos M. (2000) Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review. Int. Dairy J., vol. 10., pp. 135–149.
- 3 Avila F., Baily M.P., Perelman P., Das P.J., Pontius J., Chowdhary R. et al. (2014a) A comprehensive whole-genome integrated cytogenetic map for the alpaca (*Lama pacos*). Cytogenet. Genome Res., vol. 144, pp. 196–207.
- 4 Bekmanov B.O., Amirgaliyeva A.S., Mусаева А.С., Оразымбетова З.С., Досыбаев К.Ж., Хусаинова Э.М., Жапбасов Р.Ж., Жомартов А.М., Тулекей М.Д. (2015) Молекулярно-генетический анализ овец Едилбайской породы [Molecular genetic analysis of sheep of Edilbay breed]. Izvestiya Nacionalnoy akademii nauk Respubliki Kazakhstan, no. 3, pp. 28-33.
- 5 Berhe T., Seifu E., Ipsen R., Kurtu M.Y., Hansen, E.B. (2017) Processing challenges and opportunities of camel dairy products. Int. J. Food Sci., vol. 2, pp. 1–8.
- 6 Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. (2009) Milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. J. Dairy Sci., vol. 92., pp. 5335-5352.
- 7 Chessa S., Rignanese D., Berbenni M., Ceriotti G., Martini M., Pagnacco G., Caroli A. (2010) New genetic polymorphisms within ovine  $\beta$ - and *as2*-caseins. Small Ruminant Res., vol. 88, pp. 84-88.
- 8 Corral J., Padilla J., Izquierdo M. (2010) Associations between milk protein genetic polymorphisms and milk production traits in Merino sheep breed. Livest. Sci., vol. 129, pp. 73–79.
- 9 Cosenza G., Pauciullo A., Colimoro L., Mancusi A., Rando A., Di Bernardino D., Ramunno L. (2007) An SNP in the goat *CSN2* promoter region is associated with the absence of  $\beta$ -casein in milk. Anim. Genet., vol. 38, pp. 655-658.
- 10 [https://forbes.kz/news/2020/06/12/newsid\\_227295](https://forbes.kz/news/2020/06/12/newsid_227295). V Kazakhstane uvelichilos pogolovie skota [Livestock increased in Kazakhstan].
- 11 <https://www.kazportal.kz/verblyudovodstvo-v-kazahstane/>. Verbludovodstvo v Kazakhstane [Camel breeding in Kazakhstan].
- 12 <https://docplayer.ru/63720103-Instrukciya-dnk-sorb-s-m.html>. Instrukciya po primeneniyu komplekta reagentov dlya ekstrakcii DNK iz biologicheskogo materiyala DNK-sorb-S-M [Instructions for the use of a reagent kit for DNA extraction from biological material DNA-sorb-C-M].
- 13 <https://www.britannica.com/science/evolution-scientific-theory/Genetic-differentiation-during-speciation#ref311720>. Genetic differentiation during speciation.
- 14 Lee S.M., Kim H.M., Moon S.J., Kang M.J. (2012) Cloning and molecular characterization of porcine  $\beta$ -casein gene (*CNS2*). Asian-Austral. J. Anim., vol. 25, pp. 421–427.
- 15 Lewontin R.C. (1972) The Apportionment of Human Diversity. In: Dobzhansky T., Hecht M.K., Steere W.C. (eds). Evolutionary Biology. Springer.

- 16 Masatoshi Nei (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. PNAS, vol. 70, no 12., pp. 3321-3323.
- 17 Motoo Kimura, James F. Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics, vol. 49, no 4, pp. 725-738.
- 18 Nagy P., Fabri Zs.N., Varga L., Reiczigel J., Juhasz, J. (2017) Effect of genetic and nongenetic factors on chemical composition of individual milk samples from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) under intensive management. J. Dairy Sci., vol. 100, pp. 8680–8693.
- 19 Novier A.M., Ramadan Sh. I. (2020) Association of  $\beta$ -casein gene polymorphism with milk composition traits of Egyptian Maghrebi camels (*Camelus dromedarius*). Arch. Anim. Breed., vol. 63, pp. 493–500.
- 20 Pauciullo A., Giambra I., Iannuzzi L., Erhardt G. (2014) The  $\beta$ -casein in camels: molecular characterization of the CSN2 gene, promoter analysis and genetic variability. Gene., vol. 547, pp. 159–168.
- 21 Pauciullo A., Shuiep E.S., Cosenza G., Ramunno L., Erhardt G. (2013) Molecular characterization and genetic variability at  $\beta$ -casein gene (CSN3) in camels. Gene., vol. 513, pp. 22-30.
- 22 Pauciullo A, Shuiep E.T., Ogah M.D., Cosenza G., Di Stasio L., Erhardt G. (2019) Casein Gene Cluster in Camelids: Comparative Genome Analysis and New Findings on Haplotype Variability and Physical Mapping. Front. Genet., vol. 10, no 748.
- 23 Ryskaliyeva A., Henry C., Miranda G., Faye B., Konuspayeva G., Martin P. (2019) Alternative splicing events expand molecular diversity of camel CSN1S2 increasing its ability to generate potentially bioactive peptides. Sci. Rep., vol. 9, pp. 5243.
- 24 Smekenov I.T., Akishev Zh.D., Altybayeva N.A., Mukhitdinov N.M., Bisenbayev A.K. (2012) Ocenka geneticheskogo polimorfizma populacii *Berberis iliensis* Ili-Balkhashskogo regiona na osnove ISSR-markerov [Analysis of genetic polymorphism of endemic *Berberis iliensis* population in Ili-Balkhash region of Kazakhstan by ISSR-PCR]. Doklady Nacionalnoy Akademii nauk Respubliki Kazakhstan, no 4, pp. 49-57.
- 25 Soyudal B., Ardicli S., Samli H., Dincel D., Balci F. (2018) Association of polymorphisms in the CSN2, CSN3, LGB and LALBA genes with milk production traits in Holstein cows raised in Turkey. J. Hellenic Vet. Med. Soc., vol. 69, pp. 1271–1282.
- 26 Suteu M., Vlaic A., Daraban S.V. (2019) Characterization of a novel porcine CSN2 polymorphism and its distribution in five European breeds. Animals., vol. 9, no 7, pp. 419.

Г.Т. Джанузакова<sup>1\*</sup> , Д.Э. Карабалаева<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский научно-исследовательский институт проблем экологии, Казахстан, г. Алматы

\*e-mail: [gulnazdzhanuzakova@gmail.com](mailto:gulnazdzhanuzakova@gmail.com)

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

За последние несколько лет возрос интерес к микроорганизмам, обитающим в экстремальных экосистемах. Стало очевидным, что они могут служить важными объектами для изучения самых глубоких аспектов клеточной и молекулярной биологии и могут использоваться в различных отраслях биотехнологии. Кроме того, исследования таких микроорганизмов расширяют представления о многообразии используемых живыми существами физиологических и биохимических механизмов. На сегодняшний день психрофильные и психротрофные микроорганизмы имеют большое значение в пищевой промышленности, химической индустрии, сельском хозяйстве. Психрофильные и психротрофные микроорганизмы признаны потенциальным источником холодоактивных ферментов и биоактивных соединений. Такие параметры помогают данным ферментам выполнять каталитические действия при низкой кинетической энергии в холодных средах. Энзимы психрофилов эффективно работают в различных областях промышленности при низких температурах. Благодаря большей гибкости в структуре белка и более высокой связывающей способности с субстратами, в целом, психрофильные ферменты (экстремозимы/психрозимы) обладают большей каталитической активностью (примерно в 10 раз больше, чем мезофильные ферменты) при низкой температуре.

Нами были проведены исследования морфологических, физиологических и биохимических свойств 14 культур микроорганизмов, выделенных из районов Восточной Антарктиды и 12 культур, изолированных с высот 3000 м н.у.м. и 3500 м н.у.м. Малоалматинского ущелья.

Проведен отбор культур выделенных микроорганизмов на присутствие важных энзимов, обнаружены потенциальные биотехнологически значимые продуценты протеолитических, амилитических, липолитических ферментов, определена оксидазная и каталазная активность.

**Ключевые слова:** психрофильные микроорганизмы, экстремальные экосистемы, Антарктида.

G.T. Januzakova<sup>1\*</sup>, D.E. Karabalayeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Kazakh Scientific Research Institute of Ecological Problems, Kazakhstan, Almaty

\*e-mail: [gulnazdzhanuzakova@gmail.com](mailto:gulnazdzhanuzakova@gmail.com)

## Isolation and research of morphological, physiological and biochemical properties of psychrophilic microorganisms

Over the past few years, the interest in microorganisms living in extreme ecosystems has increased. It is obvious, that the microorganisms can be research objects of the deeper aspects in cell and molecular biology. Moreover, research of such microorganisms expand the understanding of the variety of physiological and biochemical mechanisms used by living things. Currently, psychrophilic and psychrotrophic microorganisms are significant in the food industry, chemical industry, and agriculture. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms are recognized as a potential source of cold-active enzymes and bioactive compounds. Psychrophilic enzymes work effectively in various industries at low temperatures. Due to the greater flexibility in the protein structure and higher binding capacity with substrates, in general, psychrophilic enzymes (extremozymes / psychrozymes) have a higher catalytic activity (about 10 times more than mesophilic enzymes) at low temperatures.

We have investigated the morphological, physiological and biochemical properties of 14 cultures of microorganisms isolated from the regions of East Antarctica. Additionally, there has been isolated 12 cultures from altitudes of 3000-3500 metres above sea level in Maloalmatinsky gorge.

The cultures of the isolated microorganisms were screened for the presence of biotechnologically important enzymes. Furthermore, potential producers of proteases, amylases and lipases were identified. Oxidase and catalase activity was determined.

**Key words:** psychrophilic microorganisms, extremal ecosystems, Antarctica.

Г.Т. Джанузакова<sup>1\*</sup>, Д.Э. Карабалаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Экология мәселелері Қазақ ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

\*e-mail: gulnazdzhanuzakova@gmail.com

### **Психрофильді микроорганизмдердің физиология-биохимиялық, морфологиялық қасиеттерін зерттеу және бөліп алу**

Соңғы бірнеше жылда экстремалды экожүйелерде өмір сүретін микроағзаларға деген қызығушылық артты. Олар жасушалық және молекулалық биологияның терең аспектілерін зерттеу үшін маңызды объект бола алатындығы және оларды биотехнологияның әртүрлі салаларында қолдануға болатындығы белгілі болды. Сонымен қатар, мұндай микроағзаларды зерттеу тірі тіршілік иелері қолданатын физиологиялық және биохимиялық механизмдердің әртүрлілігі туралы түсінікті кеңейтеді. Бүгінгі таңда психрофильді және психротрофты микроағзалар тамақ өнеркәсібінде, химия өнеркәсібінде және ауыл шаруашылығында үлкен маңызға ие. Психрофильді және психротрофты микроорганизмдер суыққа белсенді ферменттер мен биоактивті қосылыстардың тиімді көзі ретінде танылған микроорганизмдер. Мұндай параметрлер осы ферменттерге суық орта жағдайында төмен кинетикалық энергияда каталитикалық әрекеттерді орындауға көмектеседі. Психрофильді ферменттер төмен температурада әртүрлі өндіріс саласында тиімді жұмыс атқарады. Ақуыз құрылымындағы икемділік және субстраттармен байланысу жоғарылығы есебінде, жалпы алғанда, психрофильді ферменттер (экстремозимдер/психрозималар) төмен температурада каталитикалық белсенділікке ие (мезофильді ферменттерге қарағанда шамамен 10 есе көп).

Біз Шығыс Антарктида аймақтарынан оқшауланған 14 микроағзалар дақылының және 3000 м т.д.ж. және 3500 м т.д.ж. Кіші Алматы шатқалының биіктігінен бөлінген 12 дақылдың морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттедік.

Бөлінген микроағзалар дақылдарының биотехнологиялық маңызды ферменттерінің болуына скрининг жүргізілді, протеазалардың, амилазалардың, липазалардың әлеуетті продуценттері анықталды, оксидазалық және каталаза белсенділігі анықталды.

**Түйін сөздер:** психрофильді микроағзалар, экстремалды экожүйелер, Антарктида.

### **Введение**

Микроорганизмы могут расти в широком диапазоне температур. Соответственно, они были разделены на три широкие категории – термофилы, мезофилы и психрофилы. Последняя категория подразделяется на психрофилов с оптимальной температурой роста ниже 15°C и выше (предел 20°C), и психротрофов (психротолерантов) со способностью расти при 0°C или ниже, но оптимально данные микроорганизмы могут расти при температуре около 20–25°C. Адаптированные к холоду микроорганизмы также могут быть классифицированы как стенопсихрофилы, которые растут в узком диапазоне низких температур ( $T_{max} \sim 20^\circ\text{C}$  и  $T_{opt} 5\text{--}15^\circ\text{C}$ ) и эврипсихрофилы, которые могут расти в широком диапазоне температур (психротрофы / психротолеранты;  $T_{max} > 20^\circ\text{C}$  и  $T_{min} < 0^\circ\text{C}$  с  $T_{opt} > 20^\circ\text{C}$ ). И психрофилы, и психротрофы важны в глобальной экологии, так как большинство водных и наземных экосистем нашей планеты постоянно или сезонно подвержены низким температурам [1].

Психрофильные микроорганизмы широко распространены в мире и играют значительную

роль в эволюции и поддержании баланса биосферы Земли. Психрофилы обитают в зонах вечной мерзлоты, замерзшей почве, океанах, озерах, ледниках и т.п. [2].

Ранее считалось, что горные районы не содержат никакой жизни, но достижения в области науки и техники открыли множество микроорганизмов, обитающих в условиях экстремально низких температур (ледники, снег, лед и т. д.) и играющих ключевые роли в экологических процессах. Криосфера в целом стала значительной частью глобальной экологии. К примеру, микробное разнообразие Гималаев проявило сходство с засушливыми почвами Антарктики и другими высокогорными регионами, что указывает на тесную взаимосвязь их климатических условий. Такие сравнительные исследования имеют преимущество для понимания распространения биогеохимических процессов по всему миру [3]. Холодоактивные энзимы (экстремозимы/психрозимы), продуцируемые психрофильными и психротрофными микроорганизмами, отличаются от энзимов, синтезируемых мезофилами и термофилами, ввиду их способности катализировать биохимические реакции при низких температурах [4]. Благодаря широкому биотехноло-

гическому потенциалу, энзимы психрофильных микроорганизмов привлекают особое внимание. Перспективы применения адаптированных к холоду ферментов включают переработку пищевых продуктов, преобразование биомассы и биоремедиацию окружающей среды. Помимо применения в биотехнологии, важно выяснить механизм молекулярной адаптации к холоду. Ранние исследования механизма адаптации к низким температурам в основном были сосредоточены на выделении и характеристиках адаптированных к холоду ферментов. Ферменты, адаптированные к холоду, демонстрируют более высокую каталитическую эффективность и более низкие значения константы Михаэлиса при низких температурах. Благодаря высокой гибкости структура позволяет ферменту иметь более высокую афинность – способность связывания субстрата и термическую нестабильность.

Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы имеют определенный биотехнологический потенциал, благодаря особым энзимам. Психрофильные микроорганизмы вырабатывают ферменты, которые могут выдерживать низкие температуры и другие стрессы холодных климатических условий. В последние годы повысился интерес к изучению холодоактивных энзимов. Холодоактивные энзимы обладают огромным потенциалом для фундаментальных исследований, инновационных промышленных и биотехнологических приложений, вследствие характеристик данных энзимов и их адаптивных функций. Энзимы психрофилов эффективно работают в различных областях промышленности при низких температурах [5]. Благодаря большей гибкости в структуре белка и более высокой связывающей способностью с субстратами, в целом, психрофильные ферменты (экстремозимы/психрозимы) обладают большей каталитической активностью (примерно в 10 раз больше, чем мезофильные ферменты) при низкой температуре [6]. Другие свойства, такие как стабильность и активность в определенном диапазоне pH, адаптация к солености и гидростатичность, давление и т. д. являются важными параметрами для адаптации психрофильных микроорганизмов [7].

Рентабельность благодаря меньшему количеству требований, отсутствие требований дополнительной тепловой помощи, селективная инактивация мягким жаром, высокая удельная активность – вот некоторые из преимуществ холодоактивных ферментов. Для таких желаемых свойств психрозимы представляют собой широ-

кий спектр биотехнологических агентов, например, добавки в моющие средства [8], в пищевой промышленности (ферментация, хлебобулочные изделия) [9], в биоремедиации (компостирование, биодеградация ксенобиотиков) [10] и биотрансформация и приложения молекулярной биологии, экспрессия гетерологичных генов в психрофилах [5]. Коммерчески доступные ферменты такие как протеазы, амилазы, липазы используются при низких температурах [10]. Повышенное внимание уделяется обработке пищевых продуктов при низких температурах для сохранения вкуса, текстуры и питательной ценности, а также для экономии энергии производственных процессов. В целом, основные преимущества холодоактивных ферментов заключаются в их эффективности при низкой температуре окружающей среды тем самым избегая нагрева во время процесса, а также благодаря их термоллабильности. В пищевой промышленности ферменты, адаптированные к холоду, представляют особый интерес для переработки из-за их высокой каталитической активности при температурах, которые сводят к минимуму порчу и изменения вкуса пищевых продуктов [11]. Ферменты широко используются в пищевой промышленности для приготовления напитков, молочных продуктов, выпечки и пивоваренных продуктов. В молочной промышленности используются  $\beta$ -галактозидазы, для производства безлактозных продуктов –  $\beta$ -D-галактозидазы или лактаза, специфически гидролизующая молочный сахар лактозу до глюкозы и галактозы. Это полезно при непереносимости лактозы, для гидролиза лактозы, при хранении молока при низких температурах [12]. Следует отметить, что интерес к изучению многообразия таксонов и биотехнологического потенциала микроорганизмов, населяющих экстремальные экосистемы, возрастает. Тем не менее, структурный состав и функциональные особенности микробных сообществ множества уникальных биотопов остаются почти не изученными. В особенности, в литературе малочисленны сравнительные сведения о микробиоте Восточной части Антарктиды и горных местностей. Также, отсутствуют сведения об исследованиях микробных сообществ Малоалматинского ущелья и гор Республики Казахстан в целом.

Целевыми задачами настоящей работы было выделение, физиологическая, биохимическая характеристика, рассмотрение метаболической активности и идентификация микроорганизмов, населяющих Восточную Антарктиду и горы Ма-



лоалматинского ущелья на высотах 3000м н.у.м. и 3500м н.у.м.

### Материалы и методы исследования

14 культур было выделено с Восточной части Антарктиды в рамках научно-исследовательской экспедиции Казахского Географического Общества «Полюс Независимости».

С высоты 3000м н.у.м. было выделено 9 культур, 3 культуры – с высоты 3500м н.у.м. Малоалматинского ущелья (рис.1).

Материалом для изолирования чистых культур психрофильных и психротолерантных микроорганизмов послужили пробы, взятые из разнообразных природных источников: снег (пробы были отобраны методом «конверта»), воздух. Отбор проб проводили, следуя соблюдением стерильных условий. Чистые культуры микроорганизмов получали общеустановленным ме-

тодом [13]. Для выделения и культивирования микроорганизмов применяли питательную среду МПА – мясопептонный агар в виде порошка (TMMEDIA, Индия), а также среду Сабуро в порошковой форме (TMMEDIA, Индия); культивирование проводили при 30 °С в течение 72–140ч. Морфология колоний изучалась визуально.

Микроморфологию клеток культур изолированных микроорганизмов исследовали с помощью световой микроскопии препаратов, окрашенных по Граму [13]. Для данного метода был использован микроскоп «МОТIC В1-220 А» при инструментальном увеличении  $\times 100$ .

Было проведено микроскопическое определение спорообразования путем окрашивания препарата метиленовой синью. Споры в клетках микроорганизмов можно обнаружить в окрашенных препаратах. Подвижность микроорганизмов была определена традиционным методом «наблюдение в висючей капле».

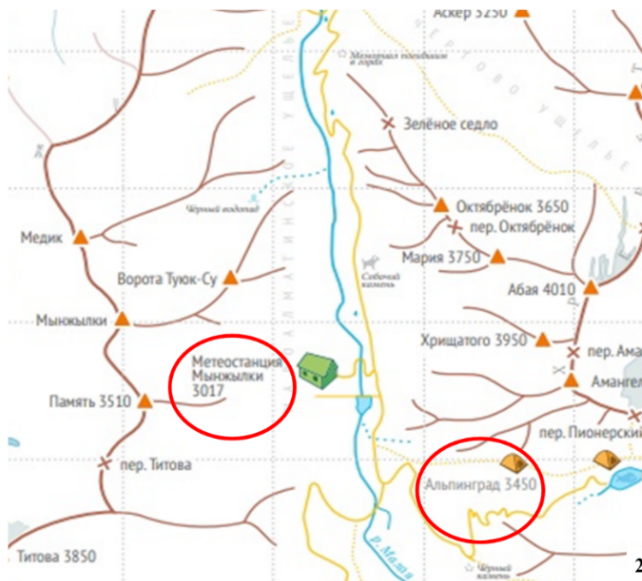


Рисунок 1 – места отбора проб: 1 – Восточная Антарктида [15]; 2 – Малоалматинское ущелье [16]

Физиолого-биохимические характеристики микроорганизмов включают в себя описание использования микроорганизмами различных соединений макро- и микроэлементов, отношение к молекулярному кислороду, рост на питательных средах и реакции превращения веществ, входящих в состав этих сред.

Образование пузырьков газа после нанесения 3% раствора перекиси водорода на культуру свидетельствовало о каталазной активности.

Оксидазный тест проводился при использовании оксидазных дисков TBL030 (VELD, Казахстан) из фильтровальной бумаги, пропитанных оксалатом N,N-диметил-парафенилендиамина, аскорбиновой кислотой и а-нафтолом. Тест на оксидазу был проведен путем снятия колонии микроорганизмов и растирания ее по оксидазному диску. Анализ результатов проводился в течение 5–10 секунд при 24–30 °С. Положительные реакции возникали через 15–60 секунд.



При отсутствии изменения цвета на оксидажном диске, а также при наличии окраски через минуту и более оценивалось как отрицательная реакция.

Активность протеолитических ферментов определяли, используя желатину в качестве субстрата (рис.3). Культуры высевались в пробирки на мясопептонную желатину (МПЖ). Посев проводился уколом. Визуально отмечали разжижение желатины. Также, указали степень разжижения и форму (кратеровидное, реповидное, воронковидное, мешковидное, послойное).

Липолитическая активность была определена путем добавления в питательную среду Tween-80 – эфира олеиновой кислоты. Способность к гидролизу субстрата отмечали при образовании вокруг колонии непрозрачной зоны нерастворимых кальциевых солей жирных кислот, высвобожденных из твина.

Амилолитическую активность выявляли путем посева культур на агаризованную среду с добавлением крахмала. Состав среды был следующий (г/л): пептон – 10,0;  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  – 5,0; растворимый крахмал – 2,0; агар – 15,0; pH среды 6,8-7,0. Гидролиз крахмала устанавливали методом обрабатывания пластинки агара раствором Люголя. Область гидролиза становилась бесцветной, либо красной, при расщеплении крахмала до декстринов.

Для того, чтобы определить способность аэробных микроорганизмов фиксировать молекулярный азот, была приготовлена среда Эшби, не содержащая азот и имеющая следующий состав (г/л): маннит – 20,0; агар – 20,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{NaCl}$  – 0,2;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,1;  $\text{CaCO}_3$  – 5,0; pH – 7,1-7,3. Обильный рост на среде Эшби свидетельствовал о принадлежности микроорганизмов к азотфиксаторам.

Сравнительное исследование изолированных культур проводили по морфологическим, культуральным, физиологическим и биохимическим свойствам, применяя определитель Берджи [14].

### Результаты исследования и их обсуждение

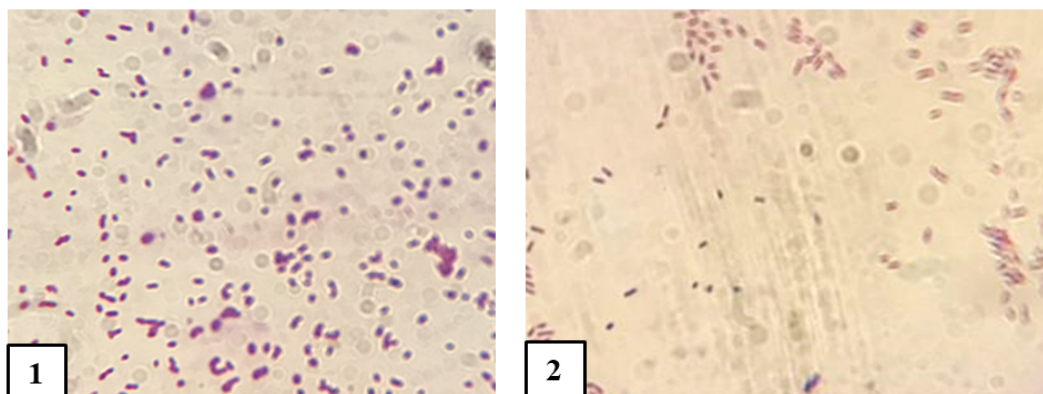
Исследование макро и микроморфологических, физиолого-биохимических особенностей культур выделенных микроорганизмов обнаружило, расположение микроорганизмов в виде кокков, коротких палочек, расположенных в виде групп и цепей (рис.2). Опираясь на лите-

ратурные данные, выявлено, что большая часть микроорганизмов, населяющих экстремальные экосистемы, в том числе и Восточную Антарктиду и высокогорные биотопы, образуют биологические пленки с развитым внеклеточным матриксом вне клетки, функциональность которых состоит в обеспечении регуляции роста и развития клеток, их защиты от условий внешней среды благодаря «чувству кворума» [17].

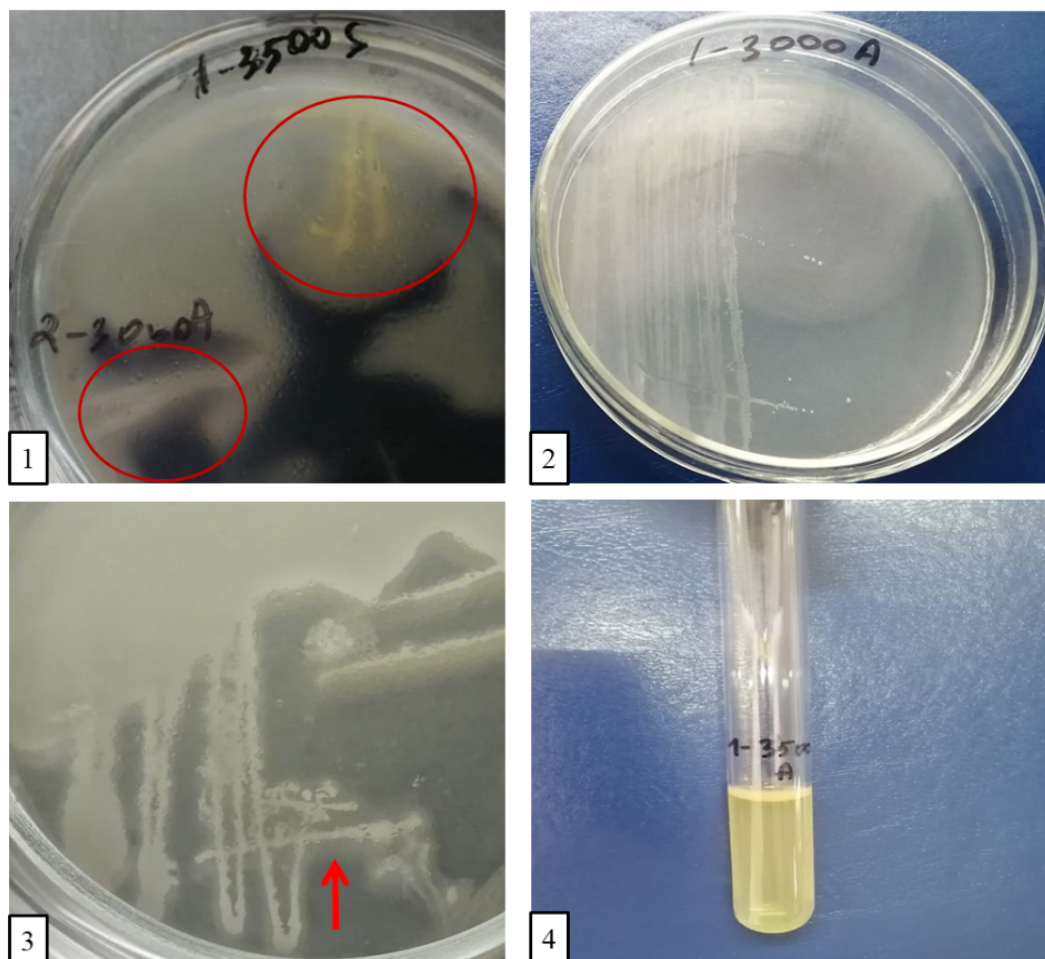
Грамм-окраска микроорганизмов выявила, что 9 антарктических культур и 10 культур, выделенных с разных высот Малоалматинского ущелья являются грамположительными и оксидазоотрицательными, 5 антарктические культуры и 2 культуры, выделенные с высот Малоалматинского ущелья являются грамотрицательными, оксидазоположительными.

Результаты исследования макро- и микроморфологических, физиологически и биохимических характеристик выделенных культур представлены в таблицах 1, 2. Выявлено, что культуры выделенных микроорганизмов Восточной Антарктиды обладают высокой каталазной, липолитической и протеолитической активностью. Как видно из таблицы 2, изоляты выделенные с высот 3000м н.у.м. и 3500м н.у.м. Малоалматинского ущелья также обладают высокой каталазной, липолитической, протеолитической и амилолитической активностью.

Механизмы адаптации микроорганизмов к условиям окружающей среды привлекают внимание в поиске новых энзимов, таких как амилазы и другие стабильные при холодной температуре биомолекулы, называемые экстремозимами, или психрозимами [18], [19], [20]. Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы, продуцирующие энзимы обладают особыми механизмами адаптации к холодным условиям среды, высокой текучестью мембран и синтезом белков, ответственных за адаптацию к низким температурам [21]. Стабильность амилаз, протеаз и липаз при низких температурах является очень важной характеристикой для процессов сохранения энергии в индустрии. Научный интерес к холодоактивным  $\alpha$ -амилазам увеличился вследствие возможностей их обширного применения в аналитической, медицинской, клинической химии, производстве крахмала, детергентов, пищевой и текстильной промышленности, очистке сточных вод, размягчении древесины при производстве бумаги, биоремедиации в холодном климате [22], [23].



**Рисунок 2** – Микрофотографии клеток изолированных культур: 72 ч культивирования на среде МПА при 30 °С, световая микроскопия,  $\times 100$ : 1 – изолят Е-2 (Антарктида); 2 – изолят 3-3000А (Мынжилки, Малоалмагинское ущелье)



**Рисунок 3** – Физиолого-биохимическая характеристика выделенных культур:  
1 – амилолитическая активность (красным выделены зоны гидролиза крахмала);  
2 – фиксация молекулярного азота (рост на безазотистой среде Эшби);  
3 – липолитическая активность (стрелкой указаны зоны расщепления олеиновой кислоты);  
4 – протеолитическая активность

Таблица 1 – Физиолого-биохимические характеристики культур, выделенных с Восточной Антарктиды

| Наименование | Подвижность | Спорообразование | Окраска по Граму | Каталитическая активность | Липолитическая активность | Амилитическая активность | Протеолитическая активность | Тест на оксидазу | Фиксация молекулярного азота | Форма клеток        |
|--------------|-------------|------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------------------|
| C-1          | -           | -                | -                | -                         | ++                        | +                        | +++                         | +                | +                            | Кокки               |
| C-2          | -           | -                | +                | +                         | +                         | -                        | +                           | -                | +                            | Шаровидные (дрожжи) |
| C-3          | +           | -                | -                | +                         | +++                       | +                        | +                           | -                | +                            | Кокки               |
| C-4          | -           | -                | +                | -                         | -                         | +                        | +                           | -                | +                            | Шаровидные (дрожжи) |
| C-5          | -           | +                | +                | +                         | ++                        | -                        | +                           | -                | +                            | Бациллы             |
| C-6          | +           | +                | +                | -                         | -                         | -                        | +                           | -                | +                            | Бациллы             |
| M-1          | -           | +                | +                | -                         | +++                       | -                        | +                           | -                | +                            | Бациллы             |
| M-2          | +           | -                | +                | +                         | -                         | -                        | +                           | -                | +                            | Кокки               |
| E-1          | -           | +                | +                | +                         | +                         | -                        | +++                         | -                | +                            | Бациллы             |
| P-1          | +           | -                | +                | +                         | +                         | -                        | +++                         | -                | +                            | Бациллы             |
| A-1          | +           | +                | +                | +                         | +                         | -                        | ++                          | -                | +                            | Бациллы             |
| M-4          | +           | -                | -                | -                         | ++                        | +                        | ++                          | +                | +                            | Кокки               |
| M-3          | -           | -                | -                | -                         | +                         | +                        | +                           | +                | +                            | Кокки               |
| E-2          | +           | +                | -                | +                         | +                         | +                        | ++                          | +                | +                            | Бациллы             |

Таблица 2 – Физиолого-биохимические характеристики культур, выделенных с высот 3000-3500 м н.у.м. в Малоалматинском ущелье

| Наименование | Подвижность | Спорообразование | Окраска по Граму | Каталитическая активность | Липолитическая активность | Амилитическая активность | Протеолитическая активность | Тест на оксидазу | Фиксация молекулярного азота | Форма клеток        |
|--------------|-------------|------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------|------------------------------|---------------------|
| 1-3000A      | +           | -                | -                | +                         | -                         | -                        | +                           | +                | +                            | Бациллы             |
| 1-3000S      | -           | -                | +                | +                         | -                         | -                        | +                           | -                | -                            | Шаровидные (дрожжи) |
| 2-3000A      | -           | -                | +                | +                         | +++                       | +                        | +                           | -                | +                            | Кокки               |
| 2-3000S      | -           | +                | +                | +                         | -                         | -                        | +                           | -                | +                            | Шаровидные (дрожжи) |
| 3-3000S      | -           | +                | +                | +                         | -                         | +                        | +                           | -                | -                            | Бациллы             |
| 4-3000S      | -           | -                | +                | -                         | +                         | +                        | +                           | -                | -                            | Бациллы             |
| 3-3000A      | -           | -                | +                | +                         | +                         | +                        | +                           | -                | -                            | Бациллы             |
| 4-3000A      | -           | +                | +                | +                         | ++                        | -                        | +                           | -                | +                            | Кокки               |
| 5-3000A      | -           | +                | +                | -                         | -                         | -                        | +                           | -                | -                            | Бациллы             |
| 1-3500S      | +           | -                | +                | -                         | -                         | +++                      | +                           | -                | +                            | Бациллы             |
| 1-3500A      | -           | -                | +                | +                         | +                         | -                        | +                           | -                | -                            | Бациллы             |
| 2-3500A      | -           | +                | -                | -                         | +                         | -                        | +                           | +                | +                            | Кокки               |

Как видно из таблиц 1 и 2, все 14 антарктических культур являются азотфиксаторами, либо способны усваивать ничтожное количество азота из воздуха, что находит свое отражение в литературных данных [24].

Наука и индустрия сконцентрировались на исследовании нового поколения амилаз, синтезируемых психрофильными микроорганизмами [25].

Использование амилаз, активных при низких температурах может быть выгодно в биотехнологических и промышленных процессах благодаря сокращению затрат на отопление, рисков микробной контаминации с мезофилами. Основываясь на литературных данных, липолитические ферменты психрофильных и психротолерантных микроорганизмов являются универсальными биокатализаторами, используемыми в энергоэффективных процессах. В соответствии с этим, липолитические психрозимы – перспективные биоинструменты для расщепления загрязняющих веществ [26].

Более 50% изучаемых антарктических и горных изолятов имели липолитическую и протеолитическую активность. Амилолитическая активность, в свою очередь, была обнаружена у 6 антарктических культур и 5 культур, выделенных с высот 3000м н.у.м. и 3500м н.у.м. Малоалматинского ущелья.

Литературные данные свидетельствуют об относительно узких диапазонах местообитаний психрофильных и психротолерантных микроорганизмов – ледники, глубины океанов и морей [27]. Психротолерантные микроорганизмы, населяющие поверхность Земли, обладают механизмами адаптации к годовым колебаниям температуры. В теплые сезоны микроорганизмы показывают быстрый рост (оптимум от 20 до 30 °С). Также, психротолеранты могут расти и при низких температурах (1–15 °С), когда другие организмы неактивны [28], [29]. Данные факты подтверждают исследования, показывающие что 25–70% микроорганизмов, выделенных из многообразных антарктических биотопов, являются психротолерантами и могут расти в широком температурном диапазоне (1–30 °С). При более низкой температуре культивирования по-

вышается продолжительность лаг-фазы роста и развития микроорганизмов Антарктиды. Несмотря на данный факт, уровень синтеза биомассы не меняется [30], [31].

Выделенные штаммы являются продуцентами внеклеточных амилолитических, протеолитических и липолитических ферментов. На основе полученных данных и анализа морфологических характеристик клеток микроорганизмов, интервала роста температур, метаболических особенностей, штаммы распределены по их принадлежности к следующим родам: *Psychrobacter* (8 культур), *Azomonas* (2 культуры), *Amphibacillus* (2 культуры). В связи с тем, что в результате схожести биохимических характеристик при установлении видовой принадлежности культур выделенных микроорганизмов могут появляться трудности, необходимо провести молекулярно-генетические исследования.

### Заключение

Таким образом, полученные данные показали перспективность и биотехнологический потенциал культур выделенных микроорганизмов.

Нами была проведена морфологическая, физиолого-биохимическая идентификация выделенных культур и получены 26 штаммов психрофильных и психротолерантных микроорганизмов. Также были определены таксоны 12 культур.

Дальнейшее исследование данных культур открывает возможности для использования их в различных областях биотехнологии, таких как – биоремедиация, пищевая и текстильная промышленность.

### Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликт интересов.

### Благодарности

Авторы статьи благодарны Ерназаровой Алие Кулахметовне за ценные рекомендации по написанию статьи.

### Литература

- 1 Pandey A. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bio-prospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem //SN Applied Sciences. – 2019. – Т.1. – №. 3. – С. 278.
- 2 Morita R. Y. Psychrophilic bacteria //Bacteriological reviews. – 1975. – Т. 39. – №. 2. – С. 144.

- 3 Dhakar K., Pandey A. Microbial Ecology from the Himalayan Cryosphere Perspective //Microorganisms. – 2020. – Т.8. – №. 2. – С. 257
- 4 Ohgiya S. et al. Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganisms //Biotechnological applications of cold-adapted organisms. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. – С. 17-34.
- 5 Feller G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology //Scientifica. – 2013. – Т. 2013.
- 6 Feller G. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures //Journal of Physics: Condensed Matter. – 2010. – Т. 22. – №. 32. – С. 323101.
- 7 Srimathi, S., Jayaraman, G., Feller, G., Danielsson, B., Narayanan, P.R., Intrinsic halotolerance of the psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Extremophiles. – 2007. – Т. 11. – №. 3. – С. 505-515.2007
- 8 Aehle W. (ed.). Enzymes in industry: production and applications. – John Wiley & Sons, 2007.
- 9 Kuddus M., Roohi A. J. M., Ramteke P. W. An overview of cold-active microbial  $\alpha$ -amylase: adaptation strategies and biotechnological potentials //Biotechnology. – 2011. – Т. 10. – №. 3. – С. 246-58.
- 10 Cavicchioli R. et al. Life and applications of extremophiles //Environmental Microbiology. – 2011. – Т. 13. – №. 8. – С.1903-1907.
- 11 Huston A. L. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes //Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. – 2008. – С. 347-363.
- 12 Hoyoux A. et al. Cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Т. 67. – №. 4. – С. 1529-1535.
- 13 Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
- 14 Дж Х. и др. Определитель бактерий Берджи //М.: Мир. – 1997. – Т. 1. – С. 1-429.
- 15 <https://bigenc.ru/geography/text/391058> (Большая Российская энциклопедия, электронная версия, дата обращения 23.01.2021)
- 16 <https://steelinside.com/tuyuk-su-map/> (Белоцерковский К. Схема вершин района Туяук-Су, дата обращения 23.01.2021)
- 17 Бактериальные сообщества в почвах криптогамных пустошей Восточной Антарктиды (оазисы Ларсеманн и Холмы Тала) / А. Г. Кудинова [и др.] // Почвоведение. – 2015, № 3 – С. 317
- 18 Ladygina N., Dedyukhina E. G., Vainshtein M. B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons //Process Biochemistry. – 2006. – Т. 41. – №. 5. – С. 1001-1014.
- 19 Sarmiento F., Peralta R., Blamey J. M. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2015. – Т. 3. – С. 148.
- 20 Frias A. et al. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria //Microbial ecology. – 2010. – Т. 59. – №. 3. – С. 476-486.
- 21 Kuddus M. et al. Cold-active extracellular  $\alpha$ -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya //Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2012. – Т. 10. – №. 1. – С. 151-159.
- 22 Anduaem B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation //International Food Research Journal. – 2014. – Т. 21. – №. 2.
- 23 Keto-Timonen R. Cold shock proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia* //Frontiers in microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 1151.
- 24 Shiozaki T. Biological nitrogen fixation detected under Antarctic sea ice //Nature Geoscience. – 2020. – Т. 13. – №. 11. – С. 729-732
- 25 Ewert M., Deming J. W. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H //Annals of Glaciology. – 2011. – Т. 52. – №. 57. – С. 111-117.
- 26 Kumar A. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation //Energy. – 2020. – Т.192. – С. 116674.
- 27 D'Amico S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life //EMBO reports. – 2006. – Т. 7. – №. 4. – С. 385-389.
- 28 Hoover R. B., Pikuta E. V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments //Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments/Ed. by AK Bej, J. Aislabie, RM Atlas.–Boca Raton (Florida): CRC Press. – 2010. – С. 115-156.
- 29 Andersen D. T. et al. Discovery of large conical stromatolites in Lake Untersee, Antarctica //Geobiology. – 2011. – Т.9. – №. 3. – С. 280-293.
- 30 Диапазон температур для роста антарктических микроорганизмов / В. А. Романовская [и др.] // Микробиол. журн. – 2012. – № 74, N 4 – С. 13–19.
- 31 Мямин В. Е. Характеристика микроорганизмов, выделенных из «зеленого снега» прибрежной зоны Восточной Антарктиды //МИКРОБНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ. – 2016. – С. 106-125.

## References

- 1 Pandey A. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bioprospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem //SN Applied Sciences. – 2019. – Т.1. – №. 3. – С. 278.
- 2 Morita R. Y. Psychrophilic bacteria //Bacteriological reviews. – 1975. – Т. 39. – №. 2. – С. 144.
- 3 Dhakar K., Pandey A. Microbial Ecology from the Himalayan Cryosphere Perspective //Microorganisms. – 2020. – Т.8. – №. 2. – С. 257

- 4 Ohgiya S. et al. Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganisms //Biotechnological applications of cold-adapted organisms. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. – S. 17-34.
- 5 Feller G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology //Scientifica. – 2013. – T. 2013.
- 6 Feller G. Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures //Journal of Physics: Condensed Matter. – 2010. – T. 22. – №. 32. – S. 323101.
- 7 Srimathi, S., Jayaraman, G., Feller, G., Danielsson, B., Narayanan, P.R., Intrinsic halotolerance of the psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Extremophiles. – 2007. – T. 11. – №. 3. – S. 505-515.2007
- 8 Aehle W. (ed.). Enzymes in industry: production and applications. – John Wiley & Sons, 2007.
- 9 Kuddus M., Roohi A. J. M., Ramteke P. W. An overview of cold-active microbial  $\alpha$ -amylase: adaptation strategies and biotechnological potentials //Biotechnology. – 2011. – T. 10. – №. 3. – S. 246-58.
- 10 Cavicchioli R. et al. Life and applications of extremophiles //Environmental Microbiology. – 2011. – T. 13. – №. 8. – S.1903-1907.
- 11 Huston A. L. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes //Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. – 2008. – S. 347-363.
- 12 Hoyoux A. et al. Cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis* //Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – T. 67. – №. 4. – S. 1529-1535.
- 13 Netrusov A.I. Praktikum po mikrobiologii. – M.: Izdatel'skij centr «Akademiya», 2005. – 608 s.
- 14 Dzh H. i dr. Opredelitel' bakterij Berdzhii //M.: Mir. – 1997. – T. 1. – S. 1-429.
- 15 <https://bigenc.ru/geography/text/391058> (Bol'shaya Rossijskaya enciklopediya, elektronnaya versiya, data obrashcheniya 23.01.2021)
- 16 <https://steelinside.com/tuyuk-su-map/> (Belocerkovskij K. Skhema vershin rajona Tuyuk-Su, data obrashcheniya 23.01.2021)
- 17 Bakterial'nye soobshchestva v pochvah kriptogamnyh pustoshej Vostochnoj Antarktidy (oazisy Larsemann i Holmy Tala) / A. G. Kudinova [i dr.] // Pochvovedenie. – 2015, № 3 – S. 317
- 18 Ladygina N., Dedyukhina E. G., Vainshtein M. B. A review on microbial synthesis of hydrocarbons //Process Biochemistry. – 2006. – T. 41. – №. 5. – S. 1001-1014.
- 19 Sarmiento F., Peralta R., Blamey J. M. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2015. – T. 3. – S. 148.
- 20 Frias A. et al. Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria //Microbial ecology. – 2010. – T. 59. – №. 3. – S. 476-486.
- 21 Kuddus M. et al. Cold-active extracellular  $\alpha$ -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya //Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2012. – T. 10. – №. 1. – S. 151-159.
- 22 Andualet B. Isolation and screening of amylase producing thermophilic spore forming Bacilli from starch rich soil and characterization of their amylase activities using submerged fermentation //International Food Research Journal. – 2014. – T. 21. – №. 2.
- 23 Keto-Timonen R. Cold shock proteins: a minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia* //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – S. 1151.
- 24 Shiozaki T. Biological nitrogen fixation detected under Antarctic sea ice //Nature Geoscience. – 2020. – T. 13. – №. 11. – S. 729-732
- 25 Ewert M., Deming J. W. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H //Annals of Glaciology. – 2011. – T. 52. – №. 57. – S. 111-117.
- 26 Kumar A. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation //Energy. – 2020. – T.192. – S. 116674.
- 27 D'Amico S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life //EMBO reports. – 2006. – T. 7. – №. 4. – S. 385-389.
- 28 Hoover R. B., Pikuta E. V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments //Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments/Ed. by AK Bej, J. Aislabie, RM Atlas.–Boca Raton (Florida): CRC Press. – 2010. – S. 115-156.
- 29 Andersen D. T. et al. Discovery of large conical stromatolites in Lake Untersee, Antarctica //Geobiology. – 2011. – T.9. – №. 3. – S. 280-293.
- 30 Diapazon temperatur dlya rosta antarkticheskikh mikroorganizmov / V. A. Romanovskaya [i dr.] // Mikrobiol. zhurn. – 2012. – № 74, N 4 – S. 13–19.
- 31 Myamin V. E. Harakteristika mikroorganizmov, vydelennyh iz "zelenogo snega" pribrezhnoj zony Vostochnoj Antarktidy //MIKROBNIYE BIOTEKHNOLOGII: FUNDAMENTAL'NYE I PRIKLADNYE ASPEKTY. – 2016. – S. 106-125.



4-бөлім  
**АДАМ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР  
ФИЗИОЛОГИЯСЫ**








---

Section 4  
**HUMAN AND ANIMAL  
PHYSIOLOGY**

---

Раздел 4  
**ФИЗИОЛОГИЯ  
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**



Г.Д. Даулет<sup>1\*</sup> , Л.К. Бактыбаева<sup>1</sup> , А.С. Соколенко<sup>1</sup> , В.К. Ю<sup>2,3</sup> ,  
А.Б. Малмакова<sup>2,3</sup> , А.Г. Зазыбин<sup>3,4</sup> , Н.Н. Беляев<sup>5</sup> 

<sup>1</sup> Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup> Институт химических наук имени А.Б. Бектурова, Казахстан, г. Алматы

<sup>3</sup> Казахстанско-Британский университет, Казахстан, г. Алматы

<sup>4</sup> Токийский университет, Япония, Чиба, Кашива, Кашиваноха, 5-1-5, 277-8561

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии

имени Пастера, Россия, г. Санкт-Петербург

\*e-mail: daulet.guldana@mail.ru

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПЕКТР АКТИВНОСТИ АЗАГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Потребность в иммуностимуляторах и иммуномодуляторах на фармацевтическом рынке широкая. Они применяются при лечении врожденных, приобретенных иммунодефицитных состояниях, в лечении онкологических больных, в лечении больных, проживающих в экологически неблагоприятных регионах стран и т.д. И перед современной иммунофармакологией стоит глобальная задача в разработке иммуностимуляторов направленного действия. Таким образом, представленный спектр иммуностимулирующих препаратов показывает, что каждая группа иммуностимуляторов обладает определенным спектром побочных эффектов и более перспективной группой являются препараты синтетики. Поэтому, скрининг новых перспективных иммуностимуляторов синтетиков направленного действия обоснован. Для исследования гемограммы периферической крови использовали 48 взрослых лабораторных крыс-альбиносов женского пола, а также фенотипирование лимфоцитов проводили общепринятым методом непрямой флуоресценции с применением моноклональных антител. В результате лейкограмма крови изменилась в сторону развития лейкопенических процессов. В ряду исследованных соединений сравнительно низкую лимфопоэзстимулирующую активность показало соединение 2. Сравнительно высокую лимфопоэзстимулирующую активность в ряду соединений 1, 2 и 3 проявило соединение 3. Эритропоэзстимулирующая и тромбоцитопоэзстимулирующая активность у соединений 1 и 3 была на уровне препарата сравнения метилурацила.

**Ключевые слова:** иммуностимулятор, иммуномодулятор, эритропоэз, лимфоцитопения, гранулоцитопения.

G.D. Daulet<sup>1\*</sup>, L.K. Baktybaeva<sup>1</sup>, A.S. Sokolenko<sup>1</sup>, V.K. Yu<sup>2,3</sup>,  
A.B. Malmakova<sup>2,3</sup>, A.G. Zazybin<sup>3,4</sup>, N.N. Belyaev<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Institute of Chemical Sciences named after A.B. Bekturov, Kazakhstan, Almaty

<sup>3</sup>Kazakh-British Technical University, School of Chemical Engineering, Kazakhstan, Almaty

<sup>4</sup>University of Tokyo Department of Advanced Sciences and Engineering, Japan,

Chiba, Kashiwa, Kashivanoha, 5-1-5, 277-8561

<sup>5</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute, Russia, St. Petersburg

\*e-mail: daulet.guldana@mail.ru

### Biological spectrum of the activity of azheterocyclic compounds

The demand for immunostimulants and immunomodulators in the pharmaceutical market is wide. They are used in the treatment of congenital, acquired immunodeficiency states, in the treatment of cancer patients, in the treatment of patients living in ecologically unfavorable regions of countries, etc. And modern immunopharmacology faces a global challenge in the development of targeted immunostimulants. Thus, the presented spectrum of immunostimulating drugs shows that each group of immunostimulants has a certain spectrum of side effects and synthetic drugs are a more promising group. Therefore, the screening of new promising immunostimulants of targeted synthetics is justified. To study the hemogram of peripheral blood, we used 48 adult female albino laboratory rats, and phenotyping of lymphocytes was carried out by the conventional method of indirect fluorescence using monoclonal antibodies. As a result, the blood leukogram changed towards the development of leukopenic processes. Compound 2 exhibited comparatively low lymphopoiesis-stimulating activity among the compounds

studied. Compound 3 showed comparatively high lymphopoiesis-stimulating activity in the series of compounds 1, 2, and 3. The erythropoiesis-stimulating and thrombocytopoiesis-stimulating activity of compounds 1 and 3 was at the level of the reference drug methyluracil.

**Key words:** immunostimulant, immunomodulator, erythropoiesis, lymphocytopenia, granulocytopenia.

Г.Д. Дәулет<sup>1\*</sup>, А.К. Бактыбаева<sup>1</sup>, А.С. Соколенко<sup>1</sup>, В.К. Ю<sup>2,3</sup>,  
А.Б. Малмакова<sup>2,3</sup>, А.Г. Зазыбин<sup>3,4</sup>, Н.Н. Беляев<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>А.Б. Бектұров атындағы химия ғылымдарының институты, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>Қазақ-Британ техникалық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>4</sup>Токиялық университет, Жапония, Чиба, Кашива, Кашиваноха, 5-1-5, 277-8561

<sup>5</sup>Пастер атындағы Санкт-Петербургтік эпидемиология және микробиология ҒЗИ,  
Ресей, Санкт-Петербург қ.

\*e-mail: daulet.guldana@mail.ru

### Азагетероциклді қосылыстардың белсенді биологиялық спектрі

Фармацевтикалық нарықта иммуностимуляторлар мен иммуномодуляторларға сұраныс өте кең. Олар туа біткен және де жүре пайда болған иммунитет тапшылығы жағдайларын емдеуде, онкологиялық науқастарды емдеуде, елдердің экологиялық қолайсыз аймақтарында тұратын науқастарды емдеуде және т.б. жағдайларда қолданылады. Ал, заманауи иммунофармакологияның алдындағы жаһандық деңгейдегі мақсат – иммуностимуляторларды өңдеу, бұл өзекті мәселе болып отыр. Осылайша, иммуностимуляциялаушы препараттардың ұсынылып отырған спектрі иммуностимуляторлардың әр тобында белгілі-бір жанамә әсерлер спектрі бар екенін және де синтетикалық препараттардың болашағы зор топ екенін көрсетеді. Сондықтан да жаңа синтетикалық иммуностимуляторларды скринингтен өткізу негізделген. Зерттеу жұмысы барысында перифериялық қанның гемограммасын зерттеу үшін 48 ересек альбиностық зертханалық егеуқұйрықтарды қолдандық, ал лимфоциттерді фенотиптеу моноклоналды антиденелерді қолдана отырып, жанамә флуоресценцияның әдеттегі әдісімен жүргізілді. Нәтижесінде, қан лейкограммасы лейкопениялық процестердің дамуына қарай өзгерді. 2-қосылыс зерттелген бірқатар қосылыстармен салыстырмалы түрде жоғары лимфопоз-ынталандырушы белсенділікті көрсетті, 1, 2 және 3 қосылыстарда 3-қосылыс салыстырмалы түрде жоғары лимфопоз-ынталандырушы белсенділік көрсетті. 1 және 3 қосылыстарының эритропозді ынталандырушы және тромбоцитопозді ынталандырушы белсенділігі метилурацил препараты деңгейінде болды.

**Түйін сөздер:** иммуностимулятор, иммуномодулятор, эритропоз, лимфоцитопения, гранулоцитопения.

### Введение

Современные алгоритмы лечения многих заболеваний включают в себя применение иммуномодулирующих средств [1, 2]. К иммуномодуляторам относят лекарственные средства различного происхождения, оказывающие разнонаправленное действие на иммунную систему, в зависимости от ее исходного состояния. Иммуномодуляторы используют в комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся признаками вторичной иммунной недостаточности, которая характеризуется часто рецидивирующими бактериальными, вирусными и грибковыми инфекциями, плохо поддающимися традиционным методам лечения [3]. Вместе с тем, требует уточнения несколько обстоятельств. Во-первых, следует понимать, что природа иммунодефицитов двояка: они подраз-

деляются на первичные и вторичные. В основе первичных иммунодефицитов нарушения локализуется на генетическом уровне, что и приводит к неэффективному функционированию иммунной системы. В этом случае говорить об иммуномодулирующей терапии бессмысленно, поскольку воздействия на иммунную систему осуществляются с заместительной целью. Например, при агаммаглобулинемии вводят насыщающие дозы внутривенных иммуноглобулинов [4, 5]. В процессе развития иммунной реакции происходит взаимодействие клеток 3 видов: макрофагов, Т-лимфоцитов хелперов и эффекторных клеток клеточного или гуморального звена иммунитета [6-11].

С практической точки зрения удобна следующая классификация иммуномодулирующих средств [12].

I. Средства бактериального происхождения:

1. Лизаты бактерий: бронхо-мунал, имудон, рибомунил, ИРС-19; 2. Микробные макромолекулярные соединения: мурамилдипептид, пирогенал, продигиозан, нуклеинат натрия [13].

II. Средства растительного происхождения: эхинацея пурпурная [14].

III. Цитокины и медиаторы: 1. Тимические гормоны: тактивин, тималин, тимоген; 2. Пептиды костного мозга: миелопид; 3. Индукторы интерферона: криданимод, тилорон, меглумин акридонат, арбидол, амизол; 4. Интерфероны: интерферон  $\alpha$ , интерферон  $\beta$ ; 5. Интерлейкины: интерлейкин-1 $\beta$ , интерлейкин-2; 6. Колонистимулирующие факторы: филграстим, молграмостим, сарграмостим; 7. Моноклональные антитела: инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб [15].

IV. Синтетические иммуномодуляторы: левamisол, галавит, полиоксидоний, имунорикс [16].

Растительные лекарственные средства весьма популярны у населения, однако доказательная база эхинацеи ограничена разрозненными нерандомизированными испытаниями, часто выполненными с огрехами в методологии исследования и наличием конфликта интересов [17]. Синтетические иммуномодуляторы – пидотимод (торговое название – Имунорикс) относится к группе химически чистых синтезированных препаратов и представляет собой препарат пептидной природы, опыт применения которого в странах Западной Европы превышает 15 лет. Одной из точек приложения действия пидотимода является усиление экспрессии гена интерлейкина-2, что, по-видимому, и приводит к повышению количества Т- и В-лимфоцитов и их функциональной активности [18]. Кроме того, в эксперименте показано, что при приеме внутрь препарат повышает функциональную активность гранулоцитов и нейтрофилов [19]. *In vitro* показано, что Пидотимод снижает экспрессию CD30-антигена на лимфоцитах (суперсемейство рецепторов для провоспалительного цитокина – фактора некроза опухолей) [20, 21]. Полиоксидоний – это физиологически активное соединение с молекулярной массой 100 кДа. По своей химической структуре он является сополимером N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбокситил)-1,4-этиленпиперазиния бромидом с молекулярной массой 80 кДа. Полиоксидоний обладает иммуномодулирующим действием, увеличивает резистентность организма в отношении локальных и генерализованных инфекций. Основой механизма иммуномодулирующего действия полиок-

сидония является прямое воздействие на фагоцитирующие клетки и естественные киллеры, а также стимуляция антителообразования [22].

В современной фармакологии выделяют следующие группы иммуностимуляторов: препараты микробного происхождения (нуклеинат натрия, рибомунил, имудон и др.); пептидные препараты (Т-активин, миелопид, тимоген и др.); цитокины и препараты на их основе (интерфероны, интерлейкины); препараты на основе природных компонентов (экстракты растений и т.д.); синтетические препараты (полиоксидоний, липоид и др.). Характерной чертой препаратов микробного происхождения является активация факторов естественной резистентности – системы мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и натуральных киллеров [23]. В силу высокой пирогенности некоторые препараты микробного происхождения первого и второго поколения не находят применения в клинике. Сейчас получены синтетические производные, разработанные на основе нулеината натрия: Poludan, Inosine pranobex (Isoprinosine), Methy-luracil and Riboxin [24, 25]. Препараты на основе нуклеината натрия способны стимулировать пролиферацию и рост иммунных клеток, клеток крови и т.д., но также способствуют интенсивному делению бактериальной микрофлоры, метастазированных очагов раковых клеток.

Иммуномодуляторы эндогенного происхождения можно условно разделить на иммунорегуляторные пептиды и цитокины [26]. Как известно, центральными органами иммунитета служат тимус и костный мозг, регулирующие развитие клеточного и гуморального иммунного ответа соответственно. Группа российских ученых под руководством академика Р.В. Петрова использовала эти органы для выделения иммунорегуляторных пептидов с целью создания лекарственных препаратов, восстанавливающих клеточный и гуморальный иммунитет [27-30]. Толчком к созданию подобных препаратов стало открытие нового класса биологически активных соединений пептидных гормонов тимуса, к которым относится семейство тимозинов, тимопоэтинов и сывороточный тимический фактор тимулин. Эти пептиды при поступлении в кровь оказывают влияние на всю периферическую иммунную систему, стимулируя рост и пролиферацию лимфоидных клеток [31].

Для активации деятельности клеток костного мозга и стимуляции лейкопоэза был разрешен к медицинскому применению нуклеинат натрия [32]. Этот препарат представляет собой

натриевую соль нуклеиновой кислоты, полученную гидролизом и дальнейшей очисткой из дрожжей. Препарат содержит большое количество предшественников нуклеиновых кислот и способствует росту и размножению практически всех делящихся клеток [33]. В дальнейшем было выявлено, что нуклеинат натрия обладает способностью стимулировать факторы как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Это вполне естественно, так как развитие иммунного ответа связано с активной пролиферацией Т- и В-лимфоцитов [34]. Нуклеинат натрия — первый препарат в своей группе, получивший разрешение на медицинское применение не только как стимулятор лейкопоэза, но и как стимулятор иммунитета. К препаратам этого ряда относятся Деринат (натриевая соль нативной ДНК, выделенной из молок осетровых рыб), Полудан (высокоочищенная смесь натриевых солей ДНК и РНК, также получаемых из молок осетровых рыб), рибонуклеат натрия (Ридостин) — препарат РНК, выделенной из пекарских дрожжей [35-37].

В настоящее время за рубежом для стимуляции иммунитета достаточно широко используются препараты растительного происхождения, в частности различные производные эхинацеи пурпурной [38].

Особой разновидностью вторичного иммунодефицита являются онкологические заболевания. Злокачественные опухоли, с одной стороны, используют иммунную систему для поддержания собственного роста, а с другой — блокируют те компоненты иммунной защиты, которые могли бы привести к отторжению опухоли [39]. При онкологических заболеваниях значительно увеличиваются численность и активность клеток с иммуносупрессивной активностью: миелоидных супрессорных клеток и регуляторных Т-клеток. Эти популяции клеток иммунной системы препятствуют развитию эффективного иммунного ответа против опухоли. Поэтому основной задачей иммунотерапии при онкологических заболеваниях является перевод иммунной системы из состояния, способствующего росту злокачественной опухоли, в состояние, способствующее ее отторжению [40].

Наиболее перспективной группой в разработке новых иммуностимулирующих препаратов являются синтетические препараты (ликопид, имунофан, полиоксидоний, левамизол, галавит, циклоферон и др.) [41, 42]. Препараты первой подгруппы — левамизол и диуцифон обладают корректирующим воздействием на Т-систему

иммунитета. Левамизол также является индуктором ИЛ-2 и обладает способностью стимулировать систему НК-клеток [43]. Но левамизол является очень токсичным препаратом. Относящийся ко второй подгруппе ликопид является синтетическим аналогом мурамилтрипептида, минимального компонента клеточной стенки всех бактерий. Этот препарат в низких дозах усиливает поглощение и разрушение микробов и опухолевых клеток фагоцитами *in vitro*, стимулирует синтез ИЛ -1 и ФНО. В свою очередь ИЛ -1 и ФНО активируют В- и Т- лимфоциты, следствием чего является усиление антителообразования и реакций клеточного иммунитета. В последние годы в иммунологической практике достаточно эффективно используется пептидный препарат четвертого поколения – имунофан. В отличие от гормонов тимуса, имунофан оказывает иммунорегулирующее действие на клетки иммунной системы вне зависимости от продукции простагландинов. Препаратом нового поколения синтетических иммуномодуляторов, полученного в результате направленного химического синтеза, является полиоксидоний. Это высокомолекулярное соединение, обладающее выраженной иммуностропной активностью. К перспективным иммуномодуляторам относится также синтетическое лекарственное средство галавит, представляющее собой производное аминоксидогидрозида [44].

## Материалы и методы

### *Исследуемые соединения.*

Азагетероциклические соединения N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид (1), N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид (2), N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид (3) впервые были синтезированы в лаборатории «Лекарственных соединений» ДГП на ПХВ Института химических наук имени А.Бектурова.

### *Метод исследования гемограммы периферической крови*

Для исследования гемограммы периферической крови использовали 48 взрослых лабораторных крыс-альбиносов женского пола, 10-15 недельного возраста, массой 210-280 г. Животные были получены одновременно из одного питомника – биологической клиники факультета биологии и биотехнологии КазНУ имени аль-Фараби. Исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения докли-

нических (неклинических) исследований биологически активных веществ» и «Этическими принципами и рекомендациями по проведению научных экспериментов на животных» [29]. Все животные содержались в однородных условиях (древесная подстилка из опилок, температура в помещении 22-24°C, режим естественного освещения), получали стандартные кормовые рационы. Животные были разделены на 6 групп по 8 особей. 6-я группа животных была интактной. С 24-х часовым интервалом проводили введение всем экспериментальным группам животных доксорубина гидрохлорид в дозе 10 мг/кг в физиологическом растворе в объеме 0, 2 – 0,21 мл 1% раствора. Через 72 часа животным вводили: 1, 2, 3-й экспериментальной группе по 0, 1- 0, 12 мл 1% раствора соединения 1, 2, 3 (доза введения 5 мг/кг на физиологическом растворе); 4 – й группе плацебо – по 0, 1- 0, 12 мл физиологического раствора; 5 – ой контрольной группе – по 0,1- 0,12 мл 1 % раствора метилурацила (доза введения 5 мг/кг на физиологическом растворе). Забор крови проводили в 09.00 утра из орбитальной вены крыс в гематологические пробирки VF-052SDK с ЭДТА ( $K_2$ ) через 7 суток после инъекции исследуемых соединений под мягким эфирным наркозом. Анализы крови проводили на гематологическом анализаторе «Abacus junior VET» (Diatron, Дания). Двойной цитологический контроль проводили на мазках крови. Мазки крови подвергали окрашиванию методом Giemsa и подсчитывали под микроскопом SA3300S под иммерсией (увеличение 7·100) по 100 клеток на каждый образец мазка, затем относительное количество клеток каждого типа переводили в абсолютное значение.

*Фенотипирование лимфоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции.*

Разделение фракций крови проводили раствором фиколл-уротраста. Фенотипирование лимфоцитов проводили общепринятым методом непрямой флуоресценции с применением моноклональных антител: ИКО 111(СД3), ИКО 101(СД4), ИКО 31(СД8), ИКО 180(СД20) (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва) [30]. Клеточные комплексы с антителами суспендировали в 20 мкл рабочего раствора FITC-конъюгатов вторичных антител (FITC-анти-мышь, пр-во: НПЦ «МедБиоСпектр», Москва) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C во влажном термостате. Фиксацию клеток проводили раствором для фиксации клеток (8%-й раствор формалина и 4%-й раствор параформальдегида). Клеточную суспензию помещали в лунки на предметном стекле. Так как

учет результатов реакции проводился на люминесцентных микроскопах предметные стекла не покрывали покровными стеклышками, а осторожно помещали объектив в лунку на стекле, используя 50% раствор глицерина в качестве иммерсионной среды. Использовали объектив микроскопа 100x и окуляр 10x. Подсчитывали светящиеся клетки в течение 24 часов после постановки реакции, сохраняя препараты в темной комнате. Микроскопирование проводилось в темной комнате. Статистическая обработка результатов проводилась с приведением среднего значения, средней ошибки и доверительного интервала Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

*Биологическая часть исследований.*

В результате трехкратной интоксикации цитостатическим препаратом доксорубина гидрохлоридом произошло снижение лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного показателя. Регистрировались следующие показатели крови: общий лейкоцитарный показатель со значения  $(12,1 \pm 0,8) \cdot 10^9$ /л крови снизился на 6-ой день наблюдения до  $(5,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$ /л крови и далее на 9-ый день наблюдения до  $(2,37 \pm 0,16) \cdot 10^9$ /л крови, т.е. в 5,11 раза ( $p \leq 0,01$ ). Лейкограмма крови изменилась в сторону развития лейкопенических процессов. Относительный лимфоцитарный показатель снизился с  $63,72 \pm 1,1\%$  до  $47,2 \pm 1,7\%$ . Произошло снижение относительного гранулоцитарного показателя с  $30,00 \pm 0,8\%$  до  $26,18 \pm 4,5\%$ . Уровень моноцитов, эозинофилов и базофилов увеличился с  $6,28 \pm 0,1\%$  до  $26,7 \pm 0,3\%$ , т.е. в 4,25 раза ( $p \leq 0,05$ ). Более значимые изменения произошли в абсолютных показателях лейкограммы крови. Значительно снизился абсолютный лимфоцитарный показатель с  $(7,71 \pm 0,1) \cdot 10^9$ /л крови до  $(1,12 \pm 0,2) \cdot 10^9$ /л крови, т.е. в 6,88 раза ( $p \leq 0,01$ ). Абсолютный гранулоцитарный показатель снизился  $(3,63 \pm 0,01) \cdot 10^9$ /л крови до  $(0,62 \pm 0,3) \cdot 10^9$ /л крови, т.е. в 5,85 раза ( $p \leq 0,01$ ). Также, несмотря на относительное увеличение относительных показателей моноцитов, эозинофилов и базофилов, абсолютный показатель эозинофилов, базофилов и моноцитов значительно снизился. Таким образом, после введения цитостатика доксорубина гидрохлорида в лейкограмме крови регистрировалась лейкопения на фоне абсолютной лимфоцитопении и гранулоцитопении.

Изменения также регистрировались в эритроцитарных показателях крови. Общий эритро-

цитарный показатель снизился с  $(7,5 \pm 0,9) \cdot 10^{12}/\text{л}$  крови до  $(4,93 \pm 0,5) \cdot 10^{12}/\text{л}$  крови. Очень быстро снизился гемоглобиновый показатель с  $(140,7 \pm 8,9)$  г/л крови до  $(90,75 \pm 6,2)$  г/л крови в 1,5 раза ( $p \leq 0,05$ ). Естественно, что среднее содержание гемоглобина в эритроцитах и цветной показатель также снизились.

Общий тромбоцитарный показатель снизился в 7,94 раза ( $p \leq 0,01$ ) с  $(560,0 \pm 12,2) \cdot 10^9/\text{л}$  крови до  $(70,5 \pm 2,33) \cdot 10^9/\text{л}$  крови. Уровень тромбокрита также снизился.

Таким образом, интоксикация организма цитостатиком доксорубина гидрохлоридом привела к панцитопении на фоне выраженной лейкопении, эритропении и тромбоцитопении. Лейкопения проявилась в виде гранулоцитопении и лимфоцитопении.

На фоне искусственно вызванной панцитопении лабораторным крысам вводили исследуемые соединения N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид (1), N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид (2), N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид (3) трехкратно с забором крови на 7-ой день после последнего введения соединений.

Соединение N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид (2) не превышал по лейкопозстимулирующей активности препарат сравнения метилурацил. Общий лейкоцитарный показатель в группах с введением данного соединения был в пределах  $(4,8 \pm 0,1) \cdot 10^9/\text{л}$  крови при значении в контрольной группе  $(5,2 \pm 0,8) \cdot 10^9/\text{л}$  крови. Все относительные и абсолютные показатели лейкограммы крови в исследуемых группах незначительно уступали аналогичным показателям контрольной группы. Абсолютный лимфоцитарный показатель в группе с введением исследуемого соединения N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид (2) был в пределах  $(2,6 \pm 0,1) \cdot 10^9/\text{л}$  крови при аналогичном показателе в контрольной группе  $(3,22 \pm 0,03) \cdot 10^9/\text{л}$  крови. Абсолютный гранулоцитарный показатель в исследуемой группе составил  $(1,52 \pm 0,2) \cdot 10^9/\text{л}$  крови против значения в контрольной группе  $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^9/\text{л}$  крови (Рисунок 1(I)).

Следует отметить высокую эритропоз- и тромбоцитопозстимулирующую активность соединения N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид (2). Общий эритроцитарный показатель в группе с введением соединения 2 составил  $(7,2 \pm 0,9) \cdot 10^{12}/\text{л}$  крови против аналогичного показателя в контрольной группе

$(5,69 \pm 0,36) \cdot 10^{12}/\text{л}$  крови и значением интактных животных  $(7,5 \pm 0,9) \cdot 10^{12}/\text{л}$  крови. То есть соединение БИВ-118 в довольно короткий срок стимулировало пролиферативную активность эритропозного пула и восстановило эритроцитарный показатель до уровня интактных животных. Гемоглобиновый показатель в группе введения соединения 2 не достиг уровня интактных животных, но был выше значения контрольной группы. Значение гемоглобина  $(137,0 \pm 12,2)$  г/л было выше показателя в контрольной группе  $(106,0 \pm 12,1)$  г/л в 1,29 раза и коррелировало с показателем в интактной группе  $(140,7 \pm 8,9)$  г/л (Рисунок 1(II)).

Соединение N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид (2) также эффективно стимулировало тромбоцитопоз в организме крыс и показатель составил  $(639,0 \pm 13,8) \cdot 10^9/\text{л}$ . Показатель экспериментальной группы превышал показатель контрольной группы  $(518,25 \pm 13,8) \cdot 10^9/\text{л}$  крови и был на уровне интактных животных  $(660,0 \pm 12,2) \cdot 10^9/\text{л}$  крови (Рисунок 1(III)). Тромбокритный показатель также коррелировал с общетромбоцитарным показателем и был высоким. В фармакологических исследованиях давно замечена закономерность – если соединение успешно стимулирует пролиферацию эритроцитарного пула, то значит оно также эффективно будет стимулировать пооз тромбоцитарного пула. Такая закономерность подтвердилась в исследованиях с соединением 2. Соединение одинаково эффективно стимулировало эритро- и тромбоцитопоз.

Соединения N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид (1) и N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид (3) очень эффективно стимулировали лейкопоз и восстановление лейкоцитарных популяций шло более выражено в лимфоцитарных субпопуляциях. Общий лейкоцитарный показатель в группе введения соединения 3 составил  $(10,9 \pm 0,7) \cdot 10^9/\text{л}$  крови, что было выше показателя контрольной группы  $(5,2 \pm 0,8) \cdot 10^9/\text{л}$  крови в 2,09 раза ( $p \leq 0,05$ ) и приблизилось к показателю интактных животных  $(12,1 \pm 0,8) \cdot 10^9/\text{л}$  крови животных. Абсолютный лимфоцитарный показатель составил  $(8,6 \pm 0,2) \cdot 10^9/\text{л}$  крови против показателя контрольной группы  $(3,22 \pm 0,03) \cdot 10^9/\text{л}$  крови, превышая в 2,67 раза ( $p \leq 0,05$ ) и коррелировал с показателем интактной группы  $(7,71 \pm 0,1) \cdot 10^9/\text{л}$  крови. Относительный лимфоцитарный показатель лейкограммы крови животных также подтверждал высокий абсолютный лимфоцитарный по-

казатель. Относительный лимфоцитарный показатель составил  $(78,55 \pm 2,1)\%$  при показателе в контрольной группе  $(62,04 \pm 3,93)\%$  и значении в интактной группе  $(63,72 \pm 1,1)\%$ . Согласно литературным источникам показатели лейкограммы крови у белых лабораторных не линейных крыс колеблются в пределах: общий лейкоцитарный показатель в пределах  $(5,00 \div 23,00) \cdot 10^9$  /л крови, относительный лимфоцитарный показатель в пределах  $(50 \div 70)\%$  и гранулоцитарный показатель  $(10 \div 50)\%$ . Следовательно, несмотря на то, что относительный лимфоцитарный показатель был выражено высокий, но он находился в пределах нормы. Относительный гранулоцитарный показатель был  $(11,7 \pm 0,9)\%$  против значения контрольной группы  $(32,68 \pm 1,6)\%$  и интактной группы  $(30,0 \pm 0,8)\%$  и превышал в 2,79 и 2,56 раза соответственно. Далее абсолютное значение лимфоцитов в группе с введением соединения 3 составило  $(8,6 \pm 0,2) \cdot 10^9$  /л крови против значения контрольной группы  $(3,22 \pm 0,03) \cdot 10^9$  /л крови и показателя интактной группы  $(7,71 \pm 0,1) \cdot 10^9$  /л крови, превышая в 2,67 и 1,11 раза соответственно. Абсолютный гранулоцитарный показатель в группе с введением соединения 3  $(1,25 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови коррелировал с показателем контрольной группы  $(1,7 \pm 0,04) \cdot 10^9$  /л крови и был ниже показателя интактной группы  $(3,63 \pm 0,31) \cdot 10^9$  /л крови в 2,90 раза ( $p \leq 0,05$ ) (Рисунок 1(I)).

Соединение N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид (1) также эффективно стимулировало лейкопоз, но уступало соединению N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид (3). Общий лейкоцитарный показатель в группе введения соединения 1 составил  $(8,97 \pm 0,8) \cdot 10^9$  /л крови, что было выше показателя контрольной группы  $(5,2 \pm 0,8) \cdot 10^9$  /л крови в 1,72 раза и ниже показателя интактных животных  $(12,1 \pm 0,8) \cdot 10^9$  /л крови животных в 1,34 раза. Абсолютный лимфоцитарный показатель в данной группе введения также был высокий  $(7,1 \pm 0,4) \cdot 10^9$  /л крови, что было выше показателя контрольной группы  $(3,22 \pm 0,03) \cdot 10^9$  /л крови в 2,20 раза и коррелировало с показателем интактной группы  $(7,71 \pm 0,1) \cdot 10^9$  /л крови. Относительный лимфоцитарный показатель составил  $(79,3 \pm 0,8)\%$ , превышая показатель контрольной группы  $(62,04 \pm 3,93)\%$  и значения в интактной группе  $(63,72 \pm 1,1)\%$  в 1,27 и 1,24 раза соответственно. Относительный гранулоцитарный показатель составил  $(8,5 \pm 0,6)\%$  и был ниже значения контрольной группы  $(32,68 \pm 1,6)\%$  и интактной группы  $(30,0 \pm 0,8)\%$  в 3,84 и 3,52 раза соответ-

ственно ( $p \leq 0,05$ ). Абсолютный гранулоцитарный показатель в группе с введением соединения 1 составлял  $(0,8 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови коррелировал с показателем контрольной группы  $(1,7 \pm 0,04) \cdot 10^9$  /л крови и был ниже показателя интактной группы  $(3,63 \pm 0,31) \cdot 10^9$  /л крови в 4,53 раза ( $p \leq 0,05$ ) (Рисунок 1(I)).

Эритропозстимулирующая и тромбоцитопозстимулирующая активность у соединений 1 и 3 была на уровне препарата сравнения метилурацила. Общий эритроцитарный показатель в группах с введением соединений 1 и 3 был в пределах  $(5,02 \div 5,82) \cdot 10^{12}$  /л крови при значении в контрольной группе  $(5,69 \pm 0,36) \cdot 10^{12}$  /л крови, но ниже показателя интактных животных  $(7,5 \pm 0,9) \cdot 10^{12}$  /л крови. Уровень гемоглобина также эффективно восстанавливался и составлял  $(107 \div 116)$  г/л при значении в контрольной группе  $(106,0 \pm 12,2)$  г/л, но ниже значения интактных животных  $(140,7 \pm 8,9)$  г/л в 1,30 и 1,20 раза соответственно (Рисунок 1(II)). Тромбоцитопозстимулирующая активность у исследуемых соединений была на уровне препарата сравнения метилурацила. Общий тромбоцитарный показатель в группах с введением соединений 1 и 3 составлял  $(503,5 \div 543,0) \cdot 10^9$  /л крови, что было на уровне контрольной группы  $(518,25 \pm 19,9) \cdot 10^9$  /л крови, но ниже чем в интактной группе  $(660,0 \pm 12,3) \cdot 10^9$  /л крови (Рисунок 1(III)).

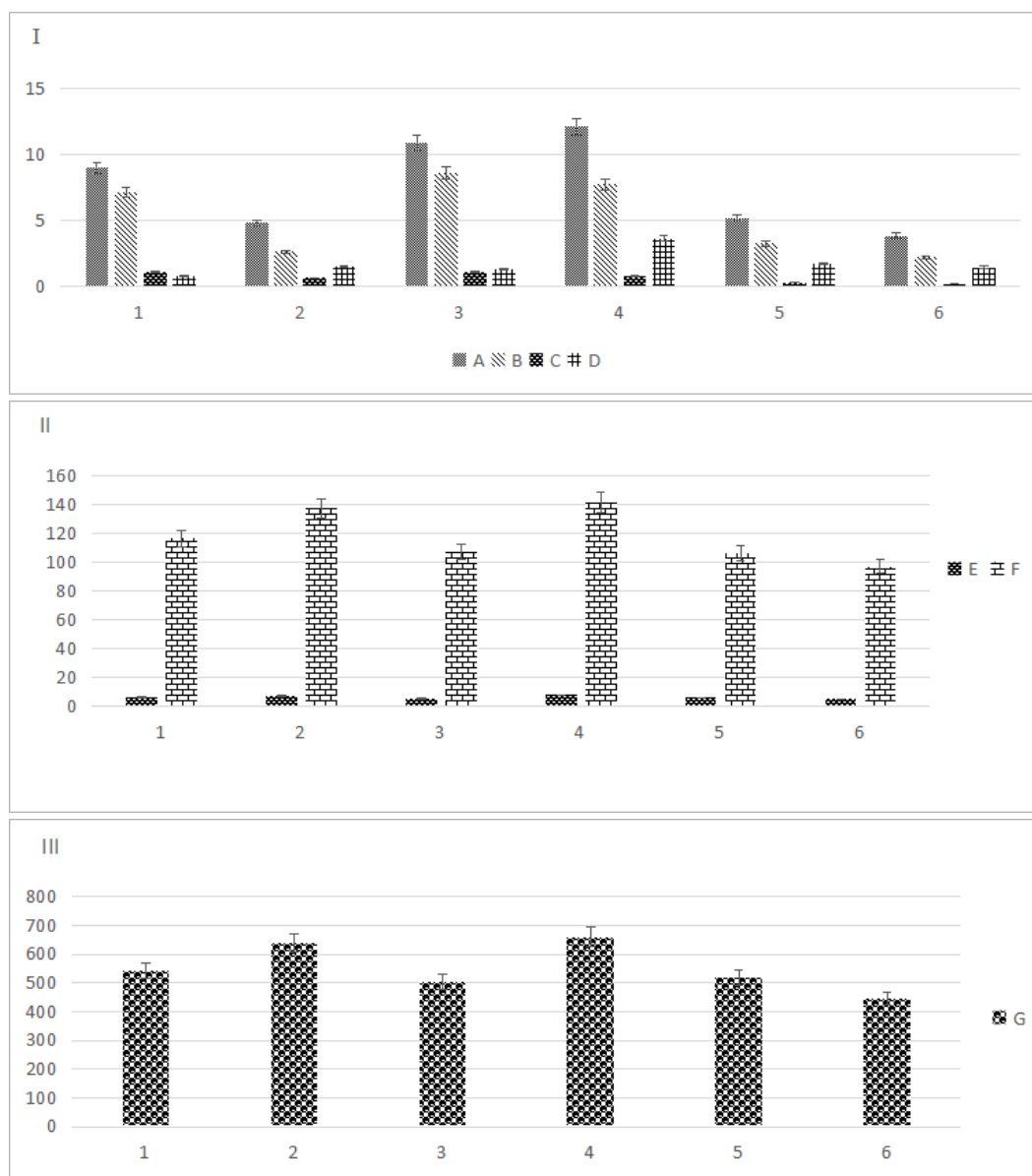
Так как соединения проявили лимфопозстимулирующую активность. На втором этапе фармакологического скрининга была проведена оценка влияния азаетероциклических соединений на пролиферацию отдельных субпопуляций  $CD3^+$  - Т-лимфоцитов,  $CD20^+$  - В-лимфоцитов,  $CD4^+$  - Т-хелперов,  $CD8^+$  - Т -цитотоксических клеток.

Сравнительно высокую лимфопозстимулирующую активность в ряду соединений 1, 2 и 3 проявило соединение 3. Активное соединение 3 увеличивало абсолютный  $CD3^+$  - Т-лимфоцитарный показатель до  $(4,37 \pm 0,9) \cdot 10^9$  /л крови, коррелируя со значением интактных животных  $(4,29 \pm 0,6) \cdot 10^9$  /л крови, достоверно превышая показатель животных группы плацебо  $(0,6 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови в 7,28 раз ( $p \leq 0,01$ ) и показатель контрольной группы  $(1,59 \pm 0,7) \cdot 10^9$  /л крови в 2,69 раза ( $p \leq 0,05$ ). Показатель  $CD20^+$  - В-лимфоцитов  $(2,02 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови был приближен к значению интактных животных  $(2,34 \pm 0,03) \cdot 10^9$  /л крови, превышая показатели контрольной группы  $(0,52 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 3,88 раза ( $p \leq 0,01$ ) и показатели группы плацебо  $(0,43 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 4,69 раза ( $p \leq 0,01$ ). Уро-



вень  $CD4^+$  - Т-хелперов  $(1,07 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови приближался к значению интактных животных  $(1,26 \pm 0,02) \cdot 10^9$  /л крови и значительно было выше значения группы плацебо  $(0,12 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 8,91 раза ( $p \leq 0,01$ ) и значения контрольной группы  $(0,57 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 1,87 раза. Уровень  $CD8^+$  - Т –цитотоксических клеток составлял  $(0,99 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови и приблизился

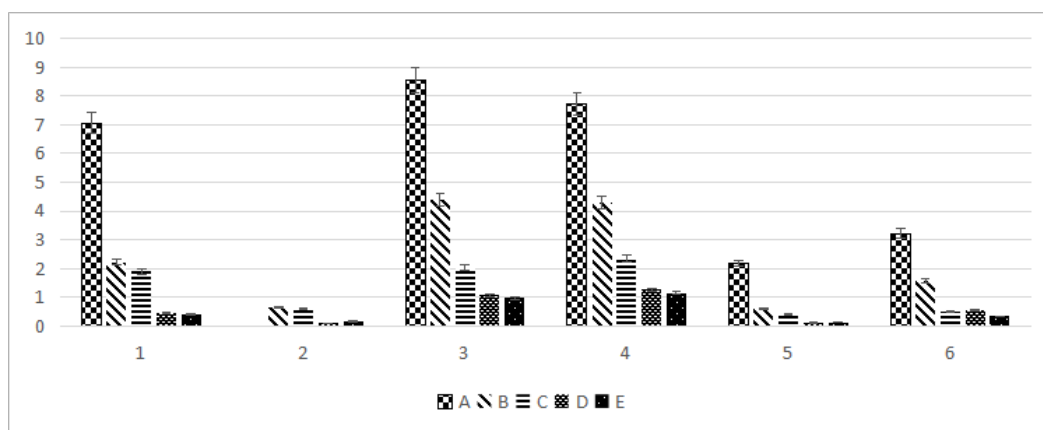
к значению интактных животных  $(1,16 \pm 0,04) \cdot 10^9$  /л крови, но превышая показатели группы плацебо  $(0,13 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 7,61 раза ( $p \leq 0,01$ ) и контрольной группы  $(0,34 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 2,91 раза (Рисунок 2). Иммунорегуляторные индексы в группе введения соединения 3 и в интактной группе были идентичны друг другу и составляли 1,08 усл.ед.



**Рисунок 1** – Гемограмма крови: общий лейкоцитарный показатель,  $\cdot 10^9$ /л (A), абсолютный лимфоцитарный показатель,  $\cdot 10^9$ /л (B), абсолютный моноцитарно-эозинофильный показатель,  $\cdot 10^9$ /л (C) и абсолютный гранулоцитарный показатель,  $\cdot 10^9$ /л (D) (Рисунок 1(I)); общий эритроцитарный показатель,  $\cdot 10^{12}$ /л (E) и гемоглобин, г/л (F) (Рисунок 1(II)), общий тромбоцитарный показатель,  $\cdot 10^9$ /л (Рисунок 1(III)). 1 – введение соединения 1; 2-введение соединения 2; 3 – введение соединения 3; 4 – интактные животные; 5 – контрольная группа, 6 – группа плацебо. Группы животных (ось абсцисс) vs показатели клеток (ось ординат).

Уступавшие по лимфопоэстимулирующей активности соединению 3 соединение 1 стимулировало лимфопоэз, но показатели Т- и В-лимфоцитов умеренно достигали средних показателей лимфоцитарных субпопуляций. В группе введения соединения 1 уровень  $CD3^{+}$ -Т-лимфоцитов достиг значения  $(2,22 \pm 0,3) \cdot 10^9$  /л крови, уступая значению интактных животных  $(4,29 \pm 0,6) \cdot 10^9$  /л крови, превышая показатели группы плацебо  $(0,6 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови в 3,7 раза ( $p \leq 0,05$ ) и контрольной группы  $(1,59 \pm 0,7) \cdot 10^9$  /л крови в 1,39 раза. Показатель  $CD3^{+}$ -Т-лимфоцитов был ниже значения группы введения соединения 3  $(4,37 \pm 0,9) \cdot 10^9$  /л крови в 1,96 раза ( $p \leq 0,05$ ). Также умеренно шло восстановление  $CD20^{+}$  – В-лимфоцитарного показателя. Он достиг значения  $(1,9 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови, что было ниже значений интактной группы  $(2,34 \pm 0,03) \cdot 10^9$  /л крови и группы с введением соединения 3 со значением  $(2,02 \pm 0,9) \cdot 10^9$  /л крови в 1,23 раза и 1,06 раза соответственно. Но  $CD20^{+}$  – В-лимфоцитарное значение в группе введения соединения 1 было значительно ниже показателей контрольной группы  $(0,52 \pm 0,0) \cdot 10^9$  /л крови в 3,65 раза ( $p \leq 0,05$ ) и группы плацебо  $(0,43 \pm 0,0) \cdot 10^9$  /л крови в 4,41 раза ( $p \leq 0,01$ ) (Рисунок 2). Соотношение показателей  $CD4^{+}$ -

Т-хелперов,  $CD8^{+}$ -Т –цитотоксических клеток, т.е. иммунорегуляторный индекс в группе введения соединения 1 был лучше, чем в группе введения соединения 3 и составлял 1,12 усл. ед. Уровень  $CD4^{+}$ -Т-хелперов в группе введения соединения 1 составлял  $(0,46 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови, что было ниже значения группы введения соединения 3  $(1,07 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови и интактной группы  $(1,26 \pm 0,02) \cdot 10^9$  /л крови в 2,32 и 2,73 раза соответственно. Но показатель  $CD4^{+}$ -Т-хелперов в группе введения 1 был близок к значению контрольной группы  $(0,57 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови и превышал значение группы плацебо  $(0,12 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 3,83 раза ( $p \leq 0,05$ ). Аналогичный уровень показателя был в субпопуляциях  $CD8^{+}$ -Т –цитотоксических клеток. Показатель  $CD8^{+}$ -Т –лимфоцитов в группе введения соединения 1 составлял  $(0,41 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови, что было ниже значения группы введения соединения 3  $(0,99 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови в 2,41 раза и показателя интактной группы  $(1,16 \pm 0,04) \cdot 10^9$  /л крови в 2,82 раза. Но показатель  $CD8^{+}$ -Т –цитотоксических клеток в группе с введением соединения 1 был выше значений контрольной группы  $(0,34 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 1,20 раза и был значительно выше показателя группы плацебо  $(0,13 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 3,15 раза ( $p \leq 0,05$ ) (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Лимфограмма крови: абсолютный лимфоцитарный показатель,  $\cdot 10^9$ /л (A),  $CD3^{+}$  лимфоциты,  $\cdot 10^9$ /л (B),  $CD20^{+}$  лимфоциты,  $\cdot 10^9$ /л (C)  $CD4^{+}$ ,  $\cdot 10^9$ /л и  $CD8^{+}$  лимфоциты,  $\cdot 10^9$ /л (D). 1 – введение соединения 1; 2-введение соединения 2; 3 – введение соединения 3; 4 – интактные животные; 5 – контрольная группа, 6 – группа плацебо. Группы животных (ось абсцисс) vs показатели клеток (ось ординат).

В ряду исследованных соединений сравнительно низкую лимфопоэстимулирующую активность показало соединение 2. Оно уступало по активности соединениям 3 и 1, препарату сравнения метилурацилу. Лимфоцитарные

значения в группе введения соединения 2 были приближены к показателям группы плацебо. В группе введения соединения 2 уровень  $CD3^{+}$ -Т –лимфоцитов составлял  $(0,65 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови и был ниже значения интактной группы

$(4,29 \pm 0,6) \cdot 10^9$  /л крови в 6,6 раза, ниже показателей контрольной группы  $(1,59 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови в 2,44 раза. Также  $CD3^+ T$  –лимфоцитарный показатель  $(0,65 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови уступал значению группы введения соединения 1  $(2,22 \pm 0,3) \cdot 10^9$  /л крови и особенно значению группы введения соединения 3  $(4,37 \pm 0,9) \cdot 10^9$  /л крови в 3,41 и 6,72 раза соответственно. Низкий показатель был сопоставим со значением группы плацебо  $(0,6 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови. Значение  $CD20^+ B$  –лимфоцитов в группе введения соединения 2  $(0,6 \pm 0,00) \cdot 10^9$  /л крови было ниже показателей интактной группы  $(2,34 \pm 0,03) \cdot 10^9$  /л крови и групп с введением соединений 3  $(2,02 \pm 0,04) \cdot 10^9$  /л крови и 1  $(1,9 \pm 0,01) \cdot 10^9$  /л крови в 3,9 и 3,36 раза соответственно (Figure 2). Значение  $CD20^+ B$  –лимфоцитов в группе введения соединения 2 коррелировало с показателем группы введения препарата метилурацила. Показатели  $CD4^+ T$  –хелперов и  $CD8^+ T$  –цитотоксических лимфоцитов были на одном уровне и соответственно иммунорегуляторный индекс составил 1,00 усл.ед. Низкие значения обоих субпопуляций T-лимфоцитов группы введения соединений 2 были ниже значений всех групп сравнения: контрольной, плацебо и интактной.

### Заключение

Таким образом, соединения N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия

йодид и N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид обладали лейкопоэзстимулирующей активностью, превышающей активность препарата сравнения метилурацила. Выраженной лейкопоэзстимулирующей активностью обладало соединение N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид, умеренной – N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид. Восстановление лейкоцитов шло с превалированием активизации лимфоцитопоэза. Восстановление абсолютных показателей в СД-лимфоцитарных субпопуляциях шло без нарушения иммунорегуляторного индекса. Также соединения N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид и N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид обладали эритропоэз- и тромбоцитопоэз стимулирующей активностью на уровне препарата сравнения метилурацила. Соединение N,N,N-триэтил-2-(мезитиламино)-2-оксоэтанаминия йодид по лейкопоэзстимулирующей активности уступало соединениям N,N-диэтил-2-(мезитиламино)-N-метил-2-оксоэтанаминия йодид и N,N-диэтил-N-(2-(мезитиламино)-2-оксоэтил)пропан-1-аминия йодид, препарату сравнения метилурацилу, но по эритропоэз- и тромбоцитопоэзстимулирующей активности превышало по активности препарат сравнения метилурацил.

### Литература

- 1 Cantani, A. *Pediatric Allergy, Asthma and Immunology* / Arnaldo Cantani. – Berling : Springer, 2008. – P. 1619 .
- 2 Masihi, K. N. *Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections* / K. N. Masihi // *Antimicrobial Agent*. – 2010 Apr. – Vol. 14, N 3. – P. 181-191.
- 3 Новиков, Д. К. *Клиническая иммунология : учеб. пособие для студ. учреждений, обеспечивающих получение высш. мед. образования* / Д. К. Новиков, П. Д. Новиков. – Витебск : ВГМУ, . – 392. – С. 2006.
- 4 *Основы клинической иммунологии* / Э. Чепель [и др.]. – М. : Гэотар-Медиа, -2018. – С. 416.
- 5 Spickett, G. *Oxford handbook of clinical immunology and allergy* / Gavin Spickett. – Oxford : University Press, – 2016. – P. 627.
- 6 Доценко, Э. А. Место иммуномодулирующего препарата «Имунорикс» (пидотимод) в когорте иммуностимулирующих препаратов / Э. А. Доценко // *Медицинская панорама*. – 2019. – № 2. – С. 69-71.
- 7 von Andrian, U. H. T-cell function and migration. Two sides of the same coin / U. H. von Andrian, C. R. Mackay // *N Engl J Med*. – 2000 Oct. – Vol. 343, N 14. – P. 1020-1034.
- 8 Clark, E. A. How B and T cells talk to each other / E. A. Clark, J. A. Ledbetter // *Nature*. – 1994 Feb. – Vol. 367, N 6462. – P. 425-428.
- 9 Elson, C. O. Genes, microbes, and T cells – new therapeutic targets in Crohn’s disease / C. O. Elson // *N Engl J Med*. – 2012 Feb. – Vol. 346, N 8. – P. 614-616.
- 10 Hennecke, J. T cell receptor-MHC interactions up close / J. Hennecke, D. C. Wiley // *Cell*. – 2001 Jan. – Vol. 104, N 1. – P. 1-4.
- 11 Lenschow, D. J. CD28/B7 system of T cell costimulation / D. J. Lenschow, T. L. Walunas, J. A. Bluestone // *Annu Rev Immunol*. – 1996. – Vol. 14. – P. 233-258.

- 12 Weiss, A. Structure and function of the T cell antigen receptor / A. Weiss / *J Clin Invest.* – 2011 Oct. – Vol. 86, N 4. – P. 1015-1022.
- 13 Федеральное руководство по использованию лекарственных средств : (формулярная система) / под ред. А. Г. Чу-чалина, Ю. Б. Белоусова, В. В. Ясенцева. – Вып. XII. – М., – 2011. – С 938.
- 14 Mycek, M. J. Lippincott's Illustrated Reviews: pharmacology / M. J. Mycek, R. A. Harvey, P. C. Champe. – 2nd ed. – Philadelphia : Williams & Wilkins, –2000. – P. 528.
- 15 Drug Facts and Comparisons 2006. – 60th ed. – Wolters Kluwer Health, – 2006. – P. 2836.
- 16 Hardman, J. G. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics / J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman. – 10th ed. – New York : McGraw-Hill, –2017. – 2045 p.
- 17 Brody, T. M. Human Pharmacology: molecular to clinical / T. M. Brody, J. Larner, K. P. Minneman. – 3rd ed. – St. Louis : Mosby, –1998. – P. 1001.
- 18 Coppi, G. Protective effects of pidotimod against bacterial infections in mice / G. Coppi, A. Falcone, S. Manzardo // *Arzneimittelforschung.* – 1995. – Vol. 44, N 12A. – P. 1417-1421.
- 19 Katzung, B. G. Basic & Clinical Pharmacology / B. G. Katzung. – 8th ed. – New York : McGrawHill, – 2016. – P. 1228.
- 20 Dinarello, C. Proinflammatory cytokines / C. Dinarello // *Chest.* – 2000. – Vol. 118, N 2. – P. 503-508.
- 21 Immune modulator pidotimod decreases the in vitro expression of CD30 in peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatic and normal children / D. Gourgiotis [et al.] // *J. Asthma.* – 2014. – Vol. 41, N 3. – P. 285-287.
- 22 Федеральное руководство по использованию лекарственных средств : (формулярная система) / под ред. А. Г. Чу-чалина, Ю. Б. Белоусова, В. В. Ясенцева. – Вып. XII. – М., –2011. – С. 938.
- 23 Diwanay S., Gautam M., Patwardhan B. Cytoprotection and immunomodulation in cancer therapy // *Curr. Med. Chem. Anticancer.* – 2004. – Vol. 4, № 6. – P. 479–490.
- 24 Ballas Z.K., Rasmussen W.L., Krieg A.M. (1996) Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol.* 1996 Sep 1; 157(5):1840-5
- 25 Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 2; 93(7):2879-83
- 26 Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. Учебник. – 3-е изд., М., Медицина, 2010. – 752 с
- 27 Хаитов Р.М., Игнатъева Г.Л., Сидорович И.Г. Иммунология. Учебник // Москва. Медицина. – 2000. – 432 с.: илл.
- 28 Хаитов Р.М. **Иммунология: учебник 2-е изд 10-11г. +CD** // М., ГЭОТАР-Медиа. 2011 – 528с.
- 29 Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология. Атлас. М. 2011 г. – 624с.
- 30 Хаитов, Р.М. Иммунология. Учебник / Р.М.Хаитов. – М., 2009.
- 31 М.Хаитов, А.А.Ярилин, Б.В.Пинегин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 624 с.
- 32 Ярилин, А.А. Иммунология. Руководство / А.А.Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 748 с.
- 33 Мартынов А.И., Пинегин Б.В., Ярилин А.А., / Хаитов Р.М. – Оценка иммунного статуса человека в условиях воздействия химического и биологического фактора. 2011-502с.
- 34 Р. Койко, Д. Саншайн, Э. Бенджамини Иммунология. – Издательство: Академия, 2008 г. – 368 стр.
- 35 Rizzetto, L.; Ifrim, D.C.; Moretti, S.; Tocci, N.; Cheng, S.-C.; Quintin, J.; Renga, G.; Oikonomou, V.; De Filippo, C.; Weil, T.; et al. Fungal Chitin Induces Trained Immunity in Human Monocytes during Cross-talk of the Host with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 7961–7972
- 36 Ifrim, D.C.; Quintin, J.; Meerstein-Kessel, L.; Plantinga, T.S.; Joosten, L.A.B.; Van Der Meer, J.W.M.; Van De Veerdonk, F.L.; Netea, M. Defective trained immunity in patients with STAT-1-dependent chronic mucocutaneous candidiasis. *Clin. Exp. Immunol.* 2015, 181, 434–440.
- 37 Rodríguez-Prados, J.-C.; Través, P.G.; Cuenca, J.; Rico, D.; Aragonés, J.; Martín-Sanz, P.; Cascante, M.; Boscá, L. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *J. Immunol.* 2010, 185, 605–614.
- 38 Ziller, M.J.; Gu, H.; Müller, F.; Donaghey, J.; Tsai, L.T.-Y.; Kohlbacher, O.; De Jager, P.L.; Rosen, E.D.; Bennett, D.A.; Bernstein, B.E.; et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 2013, 500, 477–481.
- 39 Pacis, A.; Tailleux, L.; Morin, A.M.; Lambourne, J.; MacIsaac, J.L.; Yotova, V.; Dumaine, A.; Danckaert, A.; Luca, F.; Grenier, J.-C.; et al. Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Genome Res.* 2015, 25, 1801–1811.
- 40 Xu X., Yang J., Liu Y., Shan C., Wang Q., Chen Z., Cheng Y. (2015) The induction of prolonged myelopoietic effects in monkeys by GW003, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor genetically fused to recombinant human albumin. *J Pharm Sci.* 2015 Feb; 104(2):760-7. doi: 10.1002/jps.24121. Epub –2014 Aug 29
- 41 Zhang J., Kaupke C.J., Yousefi S., Cesario T.C., Vaziri N.D. (1995) Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol Cell.* –1995; 84(3):147-53
- 42 Holcombe R.F., McLaren C.E., Milovanovic T. Immunomodulation with low dose levamisole in patient with colonic polyps // *Cancer Detect. Prev.* – 2006. – Vol. 30, № 1. – P. 94–98.

- 43 Order of the Minister of Health of the Republic of Kazakhstan, November 19, –2009 № 745 “On approval of preclinical (non-clinical) studies of biologically active substances”
- 44 Tietz Clinical guide to laboratory tests. 4-th ed. Ed. Wu A.N.B. – USA: W.B Saunders Company, –2006.

### References

- 1 Cantani, A. Pediatric Allergy, Asthma and Immunology / Arnaldo Cantani. – Berling : Springer, 2008. – P. 1619 .
- 2 Masihi, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections / K. N. Masihi // Antimicrobial Agent. – 2010 Apr. – Vol. 14, N 3. – P. 181-191.
- 3 Novikov, D. K. Klinicheskaya immunologiya : ucheb. posobie dlya stud. uchrezhdenij, obespechivayushchih poluchenie vyssh. med. obrazovaniya / D. K. Novikov, P. D. Novikov. – Vitebsk : VGMU, . – 392. – S. 2006.
- 4 Osnovy klinicheskoy immunologii / E. CHepel' [i dr.]. – M. : Geotar-Media, -2018. – S. 416.
- 5 Spickett, G. Oxford handbook of clinical immunology and allergy / Gavin Spickett. – Oxford : University Press, – 2016. – R. 627.
- 6 Docenko, E. A. Mesto immunomoduliruyushchego preparata «Imunoriks» (pidotimod) v kogorte immunostimuliruyushchih preparatov / E. A. Docenko // Medicinskaya panorama. – 2019. – № 2. – S. 69-71.
- 7 von Andrian, U. H. T-cell function and migration. Two sides of the same coin / U. H. von Andrian, C. R. Mackay // N Engl J Med. – 2000 Oct. – Vol. 343, N 14. – P. 1020-1034.
- 8 Clark, E. A. How B and T cells talk to each other / E. A. Clark, J. A. Ledbetter // Nature. – 1994 Feb. – Vol. 367, N 6462. – P. 425-428.
- 9 Elson, C. O. Genes, microbes, and T cells – new therapeutic targets in Crohn’s disease / C. O. Elson // N Engl J Med. – 2012 Feb. – Vol. 346, N 8. – P. 614-616.
- 10 Hennecke, J. T cell receptor-MHC interactions up close / J. Hennecke, D. C. Wiley // Cell. – 2001 Jan. – Vol. 104, N 1. – P. 1-4.
- 11 Lenschow, D. J. CD28/B7 system of T cell costimulation / D. J. Lenschow, T. L. Walunas, J. A. Bluestone // Annu Rev Immunol. – 1996. – Vol. 14. – P. 233-258.
- 12 Weiss, A. Structure and function of the T cell antigen receptor / A. Weiss / J Clin Invest. – 2011 Oct. – Vol. 86, N 4. – P. 1015-1022.
- 13 Federal’noe rukovodstvo po ispol’zovaniyu lekarstvennyh sredstv : (formulyarnaya sistema) / pod red. A. G. CHuchalina, YU. B. Belousova, V. V. YAsenceva. – Vyp. XII. – M., – 2011. – S 938.
- 14 Mycek, M. J. Lippincott’s Illustrated Reviews: pharmacology / M. J. Mycek, R. A. Harvey, P. C. Champe. – 2nd ed. – Philadelphia : Williams & Wilkins, –2000. – R. 528.
- 15 Drug Facts and Comparisons 2006. – 60th ed. – Wolters Kluwer Health, – 2006. – R. 2836.
- 16 Hardman, J. G. Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics / J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. G. Gilman. – 10th ed. – New York : McGraw-Hill, –2017. – 2045 r.
- 17 Brody, T. M. Human Pharmacology: molecular to clinical / T. M. Brody, J. Larner, K. P. Minneman. – 3rd ed. – St. Louis : Mosby, –1998. – R. 1001.
- 18 Coppi, G. Protective effects of pidotimod against bacterial infections in mice / G. Coppi, A. Falcone, S. Manzardo // Arzneimittelforschung. – 1995. – Vol. 44, N 12A. – P. 1417-1421.
- 19 Katzung, B. G. Basic & Clinical Pharmacology / B. G. Katzung. – 8th ed. – New York : McGrawHill, – 2016. – R. 1228.
- 20 Dinarello, C. Proinflammatory cytokines / C. Dinarello // Chest. – 2000. – Vol. 118, N 2. – P. 503-508.
- 21 Immune modulator pidotimod decreases the in vitro expression of CD30 in peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatic and normal children / D. Gourgiotis [et al.] // J. Asthma. – 2014. – Vol. 41, N 3. – P. 285-287.
- 22 Federal’noe rukovodstvo po ispol’zovaniyu lekarstvennyh sredstv : (formulyarnaya sistema) / pod red. A. G. CHuchalina, YU. B. Belousova, V. V. YAsenceva. – Vyp. XII. – M., –2011. – S. 938.
- 23 Diwanay S., Gautam M., Patwardhan B. Cytoprotection and immynomodulation in cancer therapy // Curr. Med. Chem. Anticancer. – 2004. – Vol. 4, № 6. – P. 479–490.
- 24 Ballas Z.K., Rasmussen W.L., Krieg A.M. (1996) Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. J Immunol. 1996 Sep 1; 157(5):1840-5
- 25 Klinman D.M., Yi A.K., Beaucage S.L., Conover J., Krieg A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 2; 93(7):2879-83
- 26 Haitov R.M., Ignat’eva G.A., Sidorovich I.G. Immunologiya. Norma i patologiya. Uchebnik. – 3-e izd., M., Medicina, 2010. – 752 s
- 27 Haitov P.M., Ignat’eva G.L., Sidorovich I.G. Immunologiya. Uchebnik // Moskva. Medicina. – 2000. 432 s.: ill.
- 28 Haitov R.M Immunologiya: uchebnik 2-e izd 10-11g. +CD // M., GEOTAR-Media. 2011 – 528s.
- 29 Haitov R.M., YArilin A.A., Pinegin B.V. Immunologiya. Atlas. M. 2011 g. – 624s.
- 30 Haitov, P.M. Immunologiya. Uchebnik / R.M.Haitov. – M., 2009.
- 31 M.Haitov, A.A.YArilin, B.V.Pinegin. – M.: GEOTAR-Media, 2011. – 624 s.
- 32 YArilin, A.A. Immunologiya. Rukovodstvo / A.A.YArilin. – M.: GEOTAR-Media, 2010. – 748 s.

- 33 Martynov A.I., Pinegin B.V., YArilin A.A., / Haitov R.M. – Ocenka immunnogo statusa cheloveka v usloviyah vozdejstviya himicheskogo i biologicheskogo faktora. 2011-502s.
- 34 R. Kojko, D. Sanshaj, E. Bendzhamini Immunologiya. – Izdatel'stvo: Akademiya, 2008 g. – 368 str.
- 35 Rizzetto, L.; Ifrim, D.C.; Moretti, S.; Tocci, N.; Cheng, S.-C.; Quintin, J.; Renga, G.; Oikonomou, V.; De Filippo, C.; Weil, T.; et al. Fungal Chitin Induces Trained Immunity in Human Monocytes during Cross-talk of the Host with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2016, 291, 7961–7972
- 36 Ifrim, D.C.; Quintin, J.; Meerstein-Kessel, L.; Plantinga, T.S.; Joosten, L.A.B.; Van Der Meer, J.W.M.; Van De Veerdonk, F.L.; Netea, M. Defective trained immunity in patients with STAT-1-dependent chronic mucocutaneous candidiasis. *Clin. Exp. Immunol.* 2015, 181, 434–440.
- 37 Rodríguez-Prados, J.-C.; Través, P.G.; Cuenca, J.; Rico, D.; Aragonés, J.; Martín-Sanz, P.; Cascante, M.; Boscá, L. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *J. Immunol.* 2010, 185, 605–614.
- 38 Ziller, M.J.; Gu, H.; Müller, F.; Donaghey, J.; Tsai, L.T.-Y.; Kohlbacher, O.; De Jager, P.L.; Rosen, E.D.; Bennett, D.A.; Bernstein, B.E.; et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 2013, 500, 477–481.
- 39 Pacis, A.; Tailleux, L.; Morin, A.M.; Lambourne, J.; MacIsaac, J.L.; Yotova, V.; Dumaine, A.; Danckaert, A.; Luca, F.; Grenier, J.-C.; et al. Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Genome Res.* 2015, 25, 1801–1811.
- 40 Xu X., Yang J., Liu Y., Shan C., Wang Q., Chen Z., Cheng Y. (2015) The induction of prolonged myelopoietic effects in monkeys by GW003, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor genetically fused to recombinant human albumin. *J Pharm Sci.* 2015 Feb; 104(2):760-7. doi: 10.1002/jps.24121. Epub –2014 Aug 29
- 41 Zhang J., Kaupke C.J., Yousefi S., Cesario T.C., Vaziri N.D. (1995) Flow cytometric investigation of neutrophil activation pathways by n-formyl-Met-Leu-Phe and phorbol myristate acetate. *Biol Cell.* –1995; 84(3):147-53
- 42 Holcombe R.F., McLaren C.E., Milovanovic T. Immunomodulation with low dose levamisole in patient with colonic polyps // *Cancer Detect. Prev.* – 2006. – Vol. 30, № 1. – P. 94–98.
- 43 Order of the Minister of Health of the Republic of Kazakhstan, November 19, –2009 № 745 «On approval of preclinical (non-clinical) studies of biologically active substances»
- 44 44.Tietz Clinical guide to laboratory tests. 4-th ed. Ed. Wu A.N.B. – USA: W.B Saunders Company, –2006.

---

## МАЗМҰНЫ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

| Шолу мақалалары   | Review articles | Обзорные статьи |
|---|-----------------|-----------------|
| <i>Bakiyev S.S., Bissenbaev A.K.</i><br>Diseases caused by bacteria of the <i>Aeromonas</i> and <i>Pseudomonas</i> genus when reared fish in controlled systems ..... |                 | 4               |
| <i>Аишуурский Э.Э.</i><br>Трудноразрешимые парадоксы эволюции – всеохватывающим взором натурфилософа .....  |                 | 16              |
| <i>Ibrahim A. Abdelazim, Adilgereyeva A., Zhurabekova G.</i><br>Structure and future prospective of matrix metalloproteinases .....                                   |                 | 25              |

| 1-бөлім<br>Ботаника   | Section 1<br>Botany | Раздел 1<br>Ботаника |
|---|---------------------|----------------------|
| <i>Genievskaya Y.A., Almerekova S.S., Abugalieva A.I., Abugalieva S.I.</i><br>Genome-wide association study of grain quality traits in spring barley collection grown in Kyzylorda region .....   |                     | 36                   |
| <i>Digarbaeva A.M., Kaliyeva A.N., Nurmanbek Aidyn</i><br>Study of the heavy metals effect on the pigment system of corn varieties .....  |                     | 48                   |
| <i>Sumbabayev A.A., Matveeva E.V., Abdeshova A.B.</i><br>Primary introduction results of the genus <i>Dactylorhiza</i> necker ex nevski in the Altai Botanical Garden.....  |                     | 58                   |
| <i>Shadmanova L., Mukanova G., Murzahmetov S., Alpysbayeva A., Sankaibaeyeva A., Yerekeyeva S., Kaliyev B.</i><br>Introduction and comparative characteristic of <i>Malus sieversii</i> variety clones of the dzhungarian population..... |                     | 69                   |

| 2-бөлім<br>Биотехнология  | Section 2<br>Biotechnology | Раздел 2<br>Биотехнология |
|---|----------------------------|---------------------------|
| <i>Иманбаева М.К., Арынова Р.А., Масалимов Ж.К., Просеков А.Ю., Серикбай Г.</i><br>Создание пробиотического биопрепарата на основе лактозутилизирующих микроорганизмов.....                                   |                            | 80                        |
| <i>Маметова А.З., Успабаева А.А., Бабенко А.С., Аденбаева А.К.</i><br>Оңтүстік Қазақстанның мұнаймен ластанған топырағынан бөлініп алынған көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдерді идентификациялау ..... |                            | 91                        |

| 3-бөлім<br>Молекулалық<br>биология және генетика   | Section 3<br>Molecular biology<br>and genetics | Раздел 3<br>Молекулярная<br>биология и генетика |
|--|--|---|
| <i>Амандыкова М.Д., Тленищева А.М., Мусаева А.С., Сайто Н.</i><br>Генотипирование верблюдов Алматинской области по гену <i>CSN2</i> молочной продуктивности..... |  | 102   |
| <i>Джанузакова Г.Т., Карабалаева Д.Э.</i><br>Выделение и изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств психрофильных микроорганизмов .....          |  | 112   |

| 4-бөлім<br>Адам және жануарлар<br>физиологиясы  | Section 4<br>Human and animal<br>physiology | Раздел 4<br>Физиология<br>человека и животных |
|---|---|---|
| <i>Даулет Г.Д., Бактыбаева Л.К., Соколенко А.С., Ю В.К., Малмакова А.Б., Зазыбин А.Г., Беляев Н.Н.</i><br>Биологический спектр активности азагетероциклических соединений ..... |   | 124   |