Оригинальная статья / Original article
УДК 579.26:579.22:579.64
DOI: https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-647-656

Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 0271 на отдельные показатели неспецифической резистентности *Origanum vulgare* L. к стрессовым условиям

© А.В. Крыжко, У.М. Буджурова

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма
г. Симферополь, Российская Федерация

Резюме: *Цель – изучить влияние штамма Bacillus thuriengiensis var. darmstadiensis 0271 на биохимические показатели, определяющие неспецифическую устойчивость Origanum vulgare L. к неблагоприятным условиям внешней среды. Материалом исследований служила жидкая споровая культура штамма B. thuringiensis 0271, сортообразцы душицы обыкновенной:* ***100.1*** *с содержанием 75,5% карвакрола,* ***г-4*** *с содержанием 52,0% карвакрола,* ***№ 2*** *с содержанием 59,85% α-терпинеола,* ***№ 1*** *с преимущественным содержанием гермакрена D (21,5%) и β-кариофиллена (19,4%). Динамику сохранности спор штамма на поверхности листьев O. vulgare L. определяли по методике А.Г. Кольчевского, содержание пролина – по методике В.А. Храмова и Е.М. Агеевой. Содержание пигментов измеряли спектрофотометрически. Определение суммарного содержания фенольных соединений проводили по М.Н. Запрометову, аскорбиновой кислоты – по М.М. Окунцову, растворимых углеводов – фенольным методом. Установлено, что в листьях душицы сортообразцов* ***100.1*** *и* ***№ 1*** *через десять дней после обработки споровой культурой штамма B. thuringiensis 0271 количество хлорофиллов снижалось на 27,1 и 15,2% к контролю соответственно, а в листьях сортообразцов* ***г-4*** *и* ***№ 2*** *отмечали повышение их содержания на 91,4 и 72,7% соответственно. В листьях образца* ***г-4*** *на десятые сутки после обработки B. thuringiensis 0271 уменьшалось количество пролина и фенольных соединений в 4 раза. На десятые сутки после обработки штаммом 0271 сортообразца* ***100.1*** *наблюдалось уменьшение количества растворимых углеводов в 1,76 раза к контролю и фенольных соединений в 2,0 раза. Обработка культурой штамма B. thuringiensis 0271 растений O. vulgare L. способствовала накоплению антиоксидантов в листьях образца* ***г-4*** *на десятые сутки на 14,5% к контролю.*

Ключевые слова: *Origanum vulgare L., Bacillus thuringiensis, пролин, хлорофилл, антиоксиданты, штамм*

Благодарности: *Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образовании и науки России AAAA19-119022590066-3 and AAAA16-116022610119-2.*

Для цитирования: Крыжко А.В., Буджурова У.М. Особенности влияния штамма *Bacillus thuringiensis* 0271 на отдельные показатели неспецифической резистентности *Origanum vulgare* L. к стрессовым условиям. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2020. Т. 10. N 4. С. 647–656. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-647-656

Effects of *Bacillus thuringiensis 0271* on individual indicators of nonspecific resistance of *Origanum vulgare* L. to stressful conditions

Anastasiia V. Kryzhko, Uryane M. Budzhurova

Research Institute of Agriculture of Crimea
Simferopol, Russian Federation

Abstract: *In this paper, we aim to study the effect of the Bacillus thuriengiensis strain var. darmstadiensis 0271 on the biochemical parameters of Origanum vulgare L., which determine its nonspecific resistance to unfavourable environmental conditions. The research materials were a liquid spore culture of B. Thuringiensis 0271 and the following oregano samples:* ***100.1*** *with 75.5% of carvacrol,* ***g-4*** *with 52.0% of carvacrol,* ***No. 2*** *with 59.85% of α-terpineol,* ***No. 1*** *with 21.5% of germacrene D and 19.4% of β-caryophyllene. The preservation of the strain*

*spores on the leaf surface of Origanum vulgare was determined using A.G. Kolchevsky's method. The proline content was determined by V.A. Khramov's and E.M. Ageeva's method, while the pigment content was measured spectrophotometrically. The total content of phenolic compounds, ascorbic acid and water-soluble carbohydrates was established according to the methods by M.N. Zaprometov, M.M. Okuntsov and M. Dubois, respectively. Ten days after treating the leaves of the **100.1** and **No. 1** oregano varieties with the spore culture of B. Thuringiensis 0271, the amount of chlorophylls decreased by 27.1 and 15.2% compared to the control, respectively. At the same time, the amount of chlorophylls increased by 91.4 and 72.7% in the leaves of the **g-4** and **No. 2** varieties, respectively. On the 10th day of the experiment, the amount of proline and phenolic compounds decreased by 4 times in the leaves of the **g-4** sample. Compared to the control, the **100.1** variety demonstrated a decrease in the amount of soluble carbohydrates and phenolic compounds by 1.76 and 2.0 times, respectively. On the 10th day of the experiment, the treatment of O. vulgare plants with B. Thuringiensis 0271 promoted the accumulation of antioxidants in the leaves of the **g-4** sample by 14.5% compared to the control.*

Keywords: *Origanum vulgare L., Bacillus thuringiensis, proline, chlorophyll, antioxidants, strain*

Acknowledgments: *The work was carried out within the framework of the state assignment of the RF Ministry of Education and Science AAAA19-119022590066-3 and AAAA16-116022610119-2.*

For citation: Kryzhko AV, Budzhurova UM. Effects of *Bacillus thuringiensis 0271* on individual indicators of nonspecific resistance of *Origanum vulgare L.* to stressful conditions. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2020;10(4):647–656. (In Russian) https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-647-656

ВВЕДЕНИЕ

Душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.) хорошо известна с древнейших времен как лекарственное и ароматическое растение на всей территории Средиземноморья и в большинстве районов Евросибирского региона [1]. Она является перспективной культурой, продуцирующей вторичные метаболиты с функционально важными свойствами, применимые в пищевой промышленности, парфюмерии и косметологии (для производства отдушек мыла, лосьонов, духов и туалетной воды)[1]. Эфирное масло душицы обладает антимикробной, цитотоксической, антиоксидантной и противогрибковой активностью [2]. В состав сырья *O. vulgare* L. входят многие эффективные антиоксиданты, такие как розмариновая кислота, кофейная кислота и различные флавоноиды [3, 4]. Эфирное масло данной культуры богато в основном карвакролом [5], обладает антибиотическими, гепатозащитными [6], антидиабетическими, антиапоптотическими [7–9] свойствами.

Перспективы возделывания *O. vulgare* L. в промышленных масштабах напрямую связаны с повышением экологической и агрономической устойчивости сортообразцов к неблагоприятным условиям внешней среды. Одним из приоритетных направлений в изучении особенностей формирования устойчивости растений к стрессовым факторам является изучение основных показателей неспецифической резистентности. Адекватное функционирование механизмов неспецифической устойчивости растений душицы может быть связано с перестройкой целого ряда метаболических процессов как основного, так и вторичного обмена, что в свою очередь может влиять на накопление хозяйственно и агрономически ценных веществ, обуславливающих лекарственную и пищевую ценность культуры.

Одной из основных проблем возделывания душицы обыкновенной как ценной эфиромасличной и лекарственной культуры является защита от вредителя, относящегося к группе эриофиидных клещей. В качестве биоагента защиты душицы обыкновенной от *Eriophyes sp*. может быть использована бактерия *B. Thuringiensis.* Это широко известный энтомопатоген, традиционно использующийся для защиты сельскохозяйственных культур от листогрызущих насекомых и некоторых видов клещей. В настоящее время именно на его основе выпускается около 90–95% биопестицидов на мировом рынке. Данные спорообразующие бактерии способны формировать при споруляции параспоральные кристаллические включения белковой природы, обуславливающие главным образом их инсектицидную активность. *B. thuringiensis* в дозах, рекомендованных для биоконтроля насекомых-вредителей, совершенно безвредна для теплокровных животных, рыб, пчел и энтомофагов и может быть использована в защите лекарственных растений.

Бактерий рода Bacillus нередко используют для улучшения усвоения растениями питательных веществ, увеличения концентрации хлорофилла, пролина, а также стимуляции роста [10]. Так, установлено, что растения, инокулированные *B. subtilis, B. firmus, B. cereus, B. aryabhattai* и *B. mesonae*, улучшают ростовые характеристики и повышают скорость фотосинтеза [11–14]. Отмечено, что для *B. thuringiensis* также характерна стимуляция роста и устойчивости, связанная с синтезом индолилук-

[1]Leung A.Y., Foster S. Leung's encyclopedia of common natural ingredients. Used in food, drugs and cosmetics. John Wiley & Sons Limited, 2003. 688 p. 3rd. 2009, 845 p.

сусной кислоты, продукцией сидерофоров, биологического фосфора и калия [15–18]. В последнее время установлено наличие у бактерий данной группы комплексных свойств. Доказаны антимикробные и антифунгальные свойства *B. thuringiensis* [19, 20]. Однако влияние данного энтомопатогена на обмен веществ и основные показатели физиологического состояния растений душицы мало исследовано.

Цель данной работы – оценить влияние штамма *B. thuriengiensis* 0271 на основные биохимические показатели, определяющие неспецифическую устойчивость душицы обыкновенной к неблагоприятным условиям внешней среды, – фенольные соединения, аскорбиновую кислоту, пролин, растворимые углеводы, общего содержания антиоксидантов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу проводили на базе лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве отдела сельскохозяйственной микробиологии Научно-исследовательского института сельского хозяйства Крыма (НИИСХ Крыма). Материалом исследования послужил штамм *B. thuriengiensis* var. *Darmstadiensis* 0271 Крымской коллекции микроорганизмов НИИСХ Крыма, зарегистрированной на сайте http://www.ckp-rf.ru под номером 507484. Жидкую споровую культуру штамма получали при культивировании бактерий на технологических качалках в питательной среде на основе кукурузного экстракта и глюкозы в колбах объемом 750 мл с 50 мл питательной среды. Для изучения влияния штамма *B. thuriengiensis* 0271 на накопление протекторных соединений, антиоксидантов и пигментов фотосинтезирующего комплекса душицы растения обрабатывали жидкой споровой культурой с титром спор $0{,}4 \cdot 10^9$ в фазе бутонизации. Контролем служили растения, обработанные водой.

В исследованиях использовались следующие сортообразцы *O. vulgare* L.:**100.1** с содержанием 75,59% карвакрола, гибрид **г-4** с содержанием 52,04% карвакрола; **№ 2** с содержанием 59,85% α-терпинеола, образец **№ 1** с преимущественным содержанием гермакрена D (21,5%) и β- кариофиллена (19,4%). Выбор сортообразцов с высоким и повышенным содержанием карвакрола обусловлен наличием в литературе большого количества сведений об антимикробном эффекте фенолов (тимола, карвакрола) даже в следовых количествах [21]. Также принимались во внимание антимикробные свойства α-терпинеола и других компонентов эфирного масла душицы. Исследования, касающиеся изучения фитонцидной активности образцов душицы на штаммы *B. thuriengiensis* в зависимости от сроков вегетации, фитомассы и количественной оценки действия летучих фракций фитонцидов растения проводили в фенофазах: вегетативной, бутонизации и цветения. Выбор фаз обусловлен сроками активности вредителя и оптимальными сроками уборки сырья, которые в свою очередь зависят от динамики накопления эфирного масла в онтогенезе растений. Так, эриофиидным клещом (*Eriophyes sp*.) поражаются молодые побеги в фазе вегетативного развития. По литературным данным, максимальное количество эфирного масла у большинства представителей рода *Origanum*, как правило, накапливается в фазу цветения [22]. И поскольку кошение целесообразно проводить именно в фазу цветения, наши исследования завершились в данной фазе.

Определение количества спор и параспоральных включений *B. thuriengiensis* 0271 на растениях душицы обыкновенной проводили методом микробиологического анализа смывов с листьев по А.Г. Кольчевкому[2]. Содержание зеленых пигментов измеряли спектрофотометрически по методике В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгиной, Л.М. Хандобиной при длине волн 665 и 649 нм (хлорофиллы **а** и **в**) в общей спиртовой вытяжке на спектрофотометре СФ-2000[3]. Содержание пигментов в листьях душицы обыкновенной определяли в пересчете на единицу сырой массы листа, содержание пролина – спектрофотометрически в толуольной вытяжке при длине волны 490 нм по методике В.А. Храмова и Е.М. Агеевой [23]. Определение суммарного содержания фенольных соединений проводили в водных экстрактах при помощи индигокармина по М.Н. Запрометову[4]. Определение аскорбиновой кислоты проводили титрованием с 2,6-дихлорфенолиндофенолом по М.М. Окунцову[5]. Общее содержание растворимых углеводов в растениях определяли при помощи фенольних соединений[6]. Экстракцию антиоксидантов проводили в водно-эта-нольных экстрактах с детергентом мембран-

[2]Определение количества спор и параспоральных включений *Bacillus thuringiensis* на растениях и в почве: метод. указания / сост. А.Г. Кольчевский, А.Я. Лескова, К.Г. Хомякова и др. Л.: ВИЗР, 1984. 11 с.
[3]Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. М.: Высш. шк., 1975. 392 с.
[4]Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений (для биологических специальностей университетов). М.: Высш. шк., 1974.
[5]Окунцов М.М., Аксенова О.Ф., Вертоухова Г.С. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Томск : Изд-во Томского ун-та, 1974. 114 с.
[6]Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. 1956. Vol. 28. Issue 3. P. 350–356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017

ных структур тритоном Х-100 в течение 24 ч. Определение общего содержания антиоксидантов осуществляли по восстановлению хлорного железа(III) до хлористого железа(II), количество которого устанавливалось по интенсивности окраски при добавлении о-фенантролина[7].

Достоверность разницы между опытными и контрольными вариантами оценивали по критерию Стьюдента. В работе использовали современные методы статистических исследований с применением ПО Microsoft Excel и ППП Statistica 7 [24].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Воздействие штамма *B. thuringiensis* 0271 на физиологические показатели душицы обыкновенной может быть связано с сохранностью спор на листьях. Сохранность биоинсектицида на основе споровой культуры штамма *B. thuringiensis* на листьях растения зависит от целого ряда причин. Главными среди них традиционно считают инсоляцию, температуру, влажность и осадки. Ультрафиолетовое излучение инактивирует большинство бактерий [25]. Данный вопрос, в связи с климатическими особенностями, очень актуален для Республики Крым. Одним из безусловно важных факторов, влияющих на энтопатогенные микроорганизмы в биоценозе душицы обыкновенной, являются фитонциды и экстрактивные вещества растений. Принимая во внимание высокое содержание бактерицидных веществ – карвакрола, п-цимена, γ-терпинена и α-терпинеола в тканях сортообразцов, изучалась динамика сохранности штамма *B. thuringiensis* 0271 на листьях душицы обыкновенной.

В день постановки опыта и далее в течение 10 суток наблюдали безветренную солнечную погоду со средней температурой воздуха 23,1 ºС и длительностью солнечного дня 10,6–12,6 ч (табл. 1). Согласно данным, полученным с метеостанции Симферополь, Россия, WMO_ID=33955 (rp5.ru http://rp5.ru) в период полевых исследований (выборка с 21.06.2018 г. по 02.07.2018 г.) регистрировали безоблачную погоду, осадков отмечено не было.

Анализ спор на поверхности листьев, проведенный через сутки после обработки, показал, что количество жизнеспособных спор штамма 0271 интенсивнее всего снижается на листьях сортообразцов **г-4** и **100.1** – в среднем более чем на 93,7–97,7% в сравнении с начальным количеством. Снижение количества спор на листьях сортообразцов **№ 1** и **№ 2** через сутки после обработки достигало лишь 60,6 и 76,7% соответственно. В течение трех последующих дней тенденция снижения количества спор штамма 0271 сохранялась довольно активно для всех сортообразцов (на 85,1–99,0%) за исключением **№ 1**, но уже к пятому дню уменьшилось на 96,1–99,0%, а к десятому дню – на 95,2–99,0% (см. табл. 1). Более интенсивное снижение количества спор на листьях сортообразцов **г-4** и **100.1** в первые трое суток могло быть связано с преимущественным содержанием карвакрола в их эфирном масле. Практически одинаково активное снижение количества спор штамма 0271 на листьях всех сортообразцов в более поздние сроки учета могло быть связано с интенсивной инсоляцией.

Таблица 1. Сохранность спор *B. thuringiensis* 0271 на листьях душицы обыкновенной (*O. vulgare* L.) после обработки
Table 1. Safety of *B. thuringiensis* 0271 spores on leaves after O. vulgare L. treatment

Сортообразец *Origanum vulgare* L.	Время после обработки, сут.	Число спор в расчете на 1 г листовой массы	Снижение количества спор, %	Среднесуточная температура, °С*	Общая облачность, %*
№ 1	День обработки	$1{,}8\cdot10^{7}$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$7{,}2\cdot10^{6}$	60,6	24,1	облаков нет
	3-и	$2{,}0\cdot10^{6}$	72,2	20,0	облаков нет
	5-е	$3{,}9\cdot10^{4}$	98,1	25,4	10,0
	10-е	$2{,}7\cdot10^{2}$	99,3	20,3	облаков нет
№ 2	День обработки	$2{,}8\cdot10^{7}$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$6{,}5\cdot10^{6}$	76,78	24,1	облаков нет
	3-и	$9{,}7\cdot10^{5}$	85,07	20,0	облаков нет
	5-е	$3{,}8\cdot10^{4}$	96,08	25,4	10,0
	10-е	$1{,}8\cdot10^{3}$	95,26	20,3	облаков нет
г-4	День обработки	$5{,}2\cdot10^{7}$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$3{,}4\cdot10^{6}$	93,7	24,1	облаков нет
	3-и	$4{,}9\cdot10^{5}$	99,0	20,0	облаков нет
	5-е	$3{,}8\cdot10^{5}$	99,1	25,4	10,0
	10-е	$2{,}6\cdot10^{2}$	99,9	20,3	облаков нет
100.1	День обработки	$2{,}3\cdot10^{7}$	–	26,1	облаков нет
	1-е	$0{,}5\cdot10^{6}$	97,7	24,1	облаков нет
	3-и	$2{,}4\cdot10^{5}$	99,0	20,0	облаков нет
	5-е	$2{,}1\cdot10^{5}$	99,0	25,4	10,0
	10-е	$1{,}3\cdot10^{2}$	99,9	20,3	облаков нет

[7]Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по физиологии и биохимии растений: учеб. пособие. СПб.: ГИОРД, 2013. 352 с.

Неспецифическая устойчивость растений зависит от многих факторов, основными из которых являются: регуляция поглощения кислорода; содержание пролина как осмотически активного органического вещества, способствующего удержанию воды в клетке; повышение активности функции хлоропласт, сопровождающееся активизацией синтеза хлорофилла; синтез других протекторных соединений, таких как растворимые углеводы, аскорбиновая кислота и фенольные соединения. Важнейшим регулятором неспецифической устойчивости растений к неблагоприятным факторам являются антиоксиданты – антагонисты активных форм кислорода, позволяющие поддерживать растительный гомеостаз.

Одним из основных показателей, характеризующих устойчивость растений, является активность хлоропласт, обеспечивающая адекватный уровень энергообеспечения растительных клеток. В качестве одного из показателей физиологического состояния фотосинтетического аппарата было исследовано содержание хлорофилла в листьях душицы обыкновенной.

Было отмечено, что в листьях душицы сортообразца **100.1** и образца **№ 1**, обработанных жидкой споровой культурой штамма 0271, через 10 дней после обработки снижалось количество хлорофилла на 27,1 и 15,2% к контролю соответственно (рис. 1). Напротив, в листьях душицы сортообразцов **г-4** и **№ 2** через 10 дней после обработки отмечали повышение содержания хлорофилла на 91,4 и 72,7% соответственно. Однако результаты анализа, проведенного через 20 дней после обработки, свидетельствуют об отсутствии существенного влияния обработки на исследуемый показатель для всех сортообразцов.

Различные сортообразцы душицы обыкновенной при обработке листьев жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 различались по накоплению протекторных соединений, принадлежащих к разным химическим группам (табл. 2). Так, образцы **№ 1** и **№ 2** на 10-е сутки после обработки культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 показали увеличение содержания пролина и фенольных соединений в 1,6 раза по отношению к контролю. Тенденция к накоплению пролина и фенольных соединений сохранялась у сортообразца **№ 1** и на 20-е сутки после обработки. Наблюдали увеличение содержания пролина в 1,25 и фенольных соединений в 1,31 раз к контролю. Однако в эксперименте с обработанным образцом **№ 2** наблюдали уменьшение как аккумуляции пролина, так и фенольных соединений в 1,76 раз. Обработка штаммом *B. thuringiensis* 0271 не оказывала достоверного влияния на содержание растворимых углеводов и аскорбиновой кислоты в течение всего периода эксперимента. Исключение составил сортообразец **№ 2**, при обработке которого наблюдали уменьшение содержания растворимых углеводов в 2,14 раз на 10-е сутки после обработки.

В листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки наблюдали снижение количества пролина в 4 раза и уменьшение количества фенольных соединений в 4 раза. На 20-е сутки содержание пролина и фенольных соединений в листьях душицы, обработанных жидкой споровой культурой *B. thuringiensis* 0271, находилось на уровне контроля. Штамм 0271 не оказывал достоверного влияния на накопление растворимых углеводов и аскорбиновой кислоты при обработке душицы обыкновенной образца **г-4**.

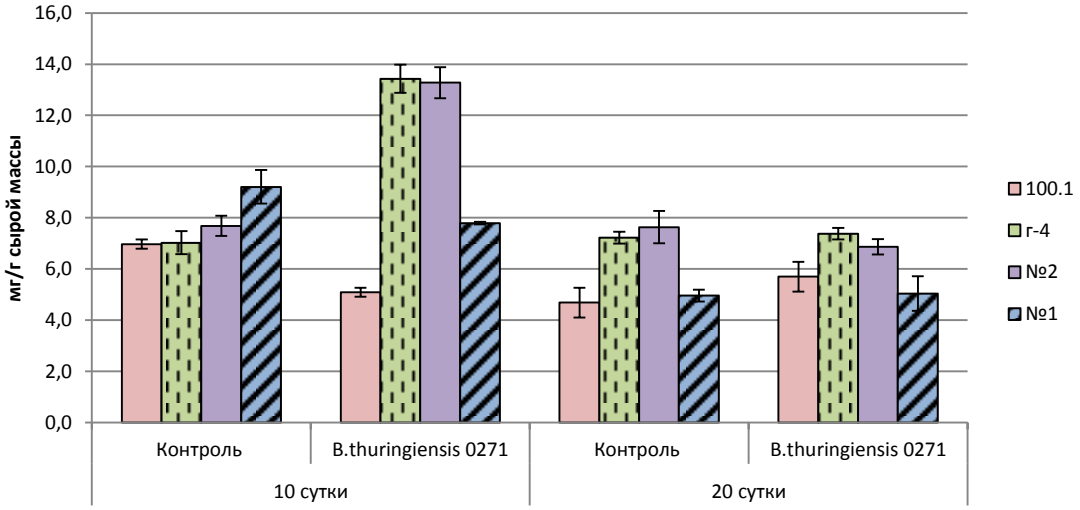

Рис. 1. Влияние штамма *B. thuringiensis* 0271 на содержание хлорофилла в листьях *O. vulgare* L. различных сортообразцов

Fig. 1. Influence of *B. thuringiensis* strain 0271 on chlorophyll content in *O. vulgare* L. leaves of various cultivars

Таблица 2. Содержание протекторных соединений в листьях *O. vulgare* L.
Table 2. Protective compounds content in *O. vulgare* L. leaves

Вариант опыта	Пролин, мкг/г сырой массы	Растворимые углеводы, мкг/г сухой массы	Аскорбиновая кислота, мг/г сырой массы	Фенольные соединения, мкг/г сырой массы
Анализ на 10-е сутки после обработки				
№1	0,09±0,01	159,31±30,41	0,12±0,001	0,009±0,002
№1+*B. thuringiensis* 0271	0,15±0,02	124,46±13,17	0,13±0,001	0,015±0,001
№2	0,05±0,001	219,20±20,62	0,16±0,001	0,005±0,0001
№2+*B. thuringiensis* 0271	0,10±0,01	102,89±3,31	0,16±0,001	0,010±0,002
г-4	0,12±0,02	97,91±11,61	0,12±0,0008	0,012±0,002
г-4+*B. thuringiensis* 0271	0,03±0,006	71,35±5,98	0,13±0,0008	0,003±0,0006
100.1	0,04±0,001	122,80±3,31	0,12±0,0008	0,004±0,0001
100.1+*B. thuringiensis* 0271	0,03±0,001	69,70±2,87	0,13±0,0008	0,002±0,0001
Анализ на 20-е сутки после обработки				
№1	0,16±0,006	157,65±16,84	0,17±0,005	0,016±0,0006
№1+*B. thuringiensis* 0271	0,20±0,01	142,71±20,43	0,17±0,004	0,021±0,002
№2	0,23±0,01	202,60±25,91	0,21±0,001	0,023±0,001
№2+*B. thuringiensis* 0271	0,13±0,01	225,69±21,76	0,20±0,004	0,013±0,001
г-4	0,16±0,025	147,69±16,34	0,16±0,006	0,016±0,002
г-4+*B. thuringiensis* 0271	0,20±0,01	127,78±22,32	0,18±0,0008	0,020±0,001
100.1	0,12±0,009	127,78±11,61	0,17±0,0014	0,013±0,0009
100.1+*B. thuringiensis* 0271	0,17±0,02	106,20±6,63	0,17±0,003	0,017±0,003

На 10-у сутки после обработки штаммом 0271 образца душицы обыкновенной **100.1** наблюдали уменьшение количества растворимых углеводов в 1,7 раза к контролю и фенольных соединений в 2,0 раза. На 20-е сутки после обработки сохранялась тенденция к уменьшению количества растворимых углеводов – с 127,7 до 106,2 мкг/г (в 1,2 раза к контролю). Анализ на 10-е сутки эксперимента показал отсутствие достоверного влияния обработки на накопление пролина. Однако на 20-е сутки наблюдали увеличение его содержания в 1,4 раза. Обработка штаммом *B. thuringiensis* 0271 достоверного влияния на содержание аскорбиновой кислоты в листьях не оказывала.

Большинство окислительно-восстановительных реакций в живых организмах проходит с участием молекулярного кислорода и катализируются ферментами. Однако эти реакции не только регулируют рост и развитие, участвуют в защитных реакциях на неблагоприятные воздействия, заживление повреждений, но и могут являться спонтанными превращениями, приводящими к окислительным повреждениям важнейших биологических молекул. Равновесие и единство антиоксидантов и прооксидантов рассматривается как неотъемлемое условие поддержания внутренней среды живых клеток [26]. Изучаемая группа терпеноидных хинонов и токохроманолов,

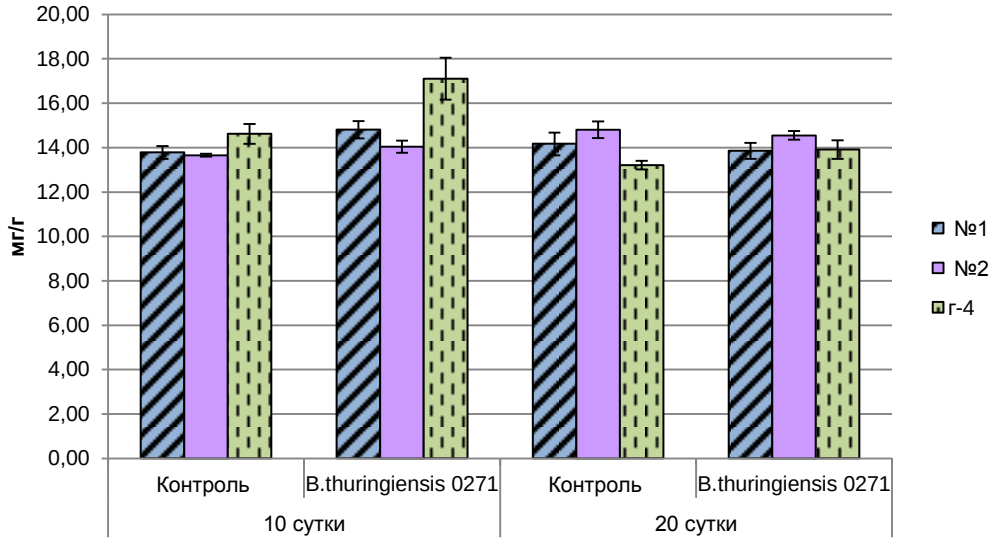

Рис. 2. Влияние штамма *B. thuringiensis* 0271 на содержание антиоксидантов в листьях *O. Vulgare* L. различных сортообразцов

Fig. 2. Influence of *B. thuringiensis* strain 0271 on the antioxidants content in *O. vulgare* L. leaves of various cultivars

в которую входят токоферолы, токотриенолы и жирорастворимые хиноны, является составной частью биомембран. Их антиоксидантная активность обусловлена способностью переходить в форму феноксильного радикала[8].

Изучение влияния обработки жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 душицы обыкновенной различных сортообразцов показало, что существенное накопление антиоксидантов (на 14,5% к контролю) отмечали лишь в листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки. Из всего вышесказанного можно заключить, что обработка культурой штамма *B. Thuringiensis* 0271 душицы обыкновенной не оказывает существенного влияния на естественно сложившиеся условия нормального метаболизма и свободнорадикального окисления.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что в листьях душицы сортообразцов **100.1** и **№ 1** через 10 дней после обработки жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 снижалось количество хлорофиллов на 27,1 и 15,2% к контролю соответственно. Напротив, в листьях душицы сортообразцов **г-4** и **№ 2** через 10 дней после обработки отмечали повышение содержания хлорофилла на 91,4 и 72,7% соответственно. Однако через 20 дней после обработки существенного влияния штамма *B. thuringiensis* 0271 на исследуемый показатель для всех сортообразцов не отмечено.

Показано, что на сохранность спор штамма *B. thuringiensis* 0271, нанесенных на поверхность листьев *O. vulgare* L., влияют как биотические, так и абиотические факторы. Интенсивное, на 93,7–97,7% в сравнении с начальным, снижение количества спор на листьях сортообразцов **г-4** и **100.1** в первые трое суток может быть связано с преимущественным содержанием карвакрола в их эфирном масле. Практически одинаково активное (на 96,1–99,0%) снижение количества спор штамма 0271 на листьях всех сортообразцов в более поздние сроки учета (5–10 сутки) может быть связано с инсоляцией.

В образцах душицы **№ 1** и **№ 2** на 10-е сутки после обработки споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 было отмечено увеличение содержания пролина и фенольных соединений в 1,6 раза к контролю. При обработке культурой образца **№ 2** наблюдали уменьшение как аккумуляции пролина, так и фенольных соединений в 1,76 раз. В листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки *B. thuringiensis* 0271 количество пролина и фенольных соединений уменьшилось в 4 раза. На 10-е сутки после обработки штаммом 0271 у образца душицы обыкновенной **100.1** наблюдали уменьшение количества растворимых углеводов в 1,76 раза к контролю, фенольных соединений – в 2,0 раза. Обработка штаммом *B. thuringiensis* 0271 достоверного влияния на содержание аскорбиновой кислоты в листьях *O. vulgare* L. не оказывала.

Показано, что обработка жидкой споровой культурой штамма *B. thuringiensis* 0271 душицы обыкновенной способствует накоплению антиоксидантов лишь в листьях образца **г-4** на 10-е сутки после обработки на 14,5% по сравнению с контролем.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙСПИСОК

1. Vokou D., Kokkini S., Bessiere J.M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils // Biochemical Systematics and Ecology. 1993. Vol. 21. Issue 2. P. 287–295.

2. Adam K., Sviropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata, Lavandula angustifolia* and *Salvia fructinosa* essential oils against human pathogenic fungi // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. Vol. 46. Issue 5. P. 1739–1745.

3. Yoshino K., Higashi N., Koga K. Antioxidant and antiinflammatory activities of oregano extract // Journal of Health Science. 2006. Vol. 52. Issue 2. P. 169–173. https://doi.org/10.1248/jhs.52.169

4. Cosge B., Turker A., Ipek I., Gurbuz B. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart, an endemic species to Turkey // Molecules. 2009. Vol. 14. Issue 5. P. 1702–1712. https://doi.org/10.3390/molecules14051702

5. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck C., Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review // Food and Chemical Toxicology. 2008. Vol. 46. Issue 2. P. 446–475. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

6. Habibi E., Shokrzadeh M., Chabra A., Naghshvar F., Keshavarz-Maleki R., Ahmadi A. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice // Pharmaceutical Biology. 2015. Vol. 53. Issue 1. P. 10–15. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.908399

7. Mohamed N.A., Nassier O.A. The antihyperglycaemic effect of the aqueous extract of *Origanium vulgare* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats // Jordan Journal of Biological Sciences. 2013. Vol. 6. Issue 1. P. 31–38.

8. Vujicic M., Nikolic I., Kontogianni V.G., Saksida T., Charisiadis P., Orescanin-Dusic Z., et al. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-

[8]Шарова Е.И. Антиоксиданты растений: учеб. пособие. СПб.: Из-во С.-Петербургского ун-та, 2016. 140 с.

apoptotic activity // British Journal of Nutrition. 2015. Vol. 113. Issue 5. P. 770–782. https://doi.org/10.1017/S0007114514004048

9. Chuang L.-T., Tsai T.-H., Lien T.-J., Huang W.-C., Liu J.-J., Chang H., et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models // Molecules. 2018. Vol. 23. Issue 8. P. 1987. https://doi.org/10.3390/molecules23081987

10. Ren H., Qin X., Huang B., Fernandez-Garcia V., Lv C. Responses of soil enzyme activities and plant growth in a eucalyptus seedling plantation amended with bacterial fertilizers // Archives of Microbiology. 2020. Vol. 202. Issue 6. P.1381–1396. https://doi.org/10.1007/s00203-020-01849-4

11. Mushtaq T., Shah A.A., Akram W., Yasin N.A. Synergistic ameliorative effect of iron oxide nanoparticles and *Bacillus subtilis* S4 against arsenic toxicity in *Cucurbita moschata*: polyamines, antioxidants, and physiochemical studies // International Journal of Phytoremediation. 2020. Vol. 22. Issue 13. P. 1408–1419. https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1781052

12. Mahmood F., Shahid M., Hussain S., Haider M.Z., Shahzad T., Ahmed T., et al. *Bacillus firmus* strain FSS_2C ameliorated oxidative stress in wheat plants induced by azo dye (reactive black-5) // 3 Biotech. 2020. Vol. 10. Issue 2. P. 40. https://doi.org/10.1007/s13205-019-2031-y

13. Khan M.A., Asaf S., Khan A.L., Jan R., Kang S.-M., Kim K.-M., et al. Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application // PLoS ONE. 2020. Vol. 15. Issue 4. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232228

14. Yoo S.-J., Weon H.-Y., Song J., Sang M.K. Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria *Bacillus aryabhattai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in tomato plants // Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019. Vol. 29. Issue 7. P. 1124–1136. https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04026

15. Saad M.M.G., Kandil M., Mohammed Y.M.M. Isolation and Identification of Plant Growth-Promoting Bacteria Highly Effective in Suppressing Root Rot in Fava Beans // Current Microbiology. 2020. Vol. 77. Issue 9. P. 2155–2165. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02015-1

16. Shreya D., Jinal H.N., Kartik V.P., Amaresan N. Amelioration effect of chromium-tolerant bacteria on growth, physiological properties and chromium mobilization in chickpea (*Cicer arietinum*) under chromium stress // Archives of Microbiology. 2020. Vol. 202. Issue 4. P. 887–894. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01801-1

17. Raddadi N., Cherif A., Ouzari H.I., Marzorati M., Brusetti L., Boudabous A., et al. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains // Annals of Microbiology. 2007. Vol. 57. Issue 4. P. 481–494. https://doi.org/10.1007/bf03175344

18. Makonde H.M., Lenga F.K., Masiga D., Mugo S., Boga H.I. Effects of *Bacillus thuringiensis* CRY1A(c) d-endotoxin on growth, nodulation and productivity of beans [*Phaseolus vulgaris* (L.) and siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.)] // African Journal of Biotechnology. 2010. Vol. 9. Issue 1. P. 017–024.

19. Azizoglu U. Bacillus thuringiensis as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt // Current Microbiology. 2019. Vol. 76. Issue 11. P. 1379–1385. https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9

20. Белоусова М.Е., Гришечкина С.Д., Ермолова В.П., Антонец К.С., Марданов А.В., Ракитин А.Л. [и др.]. Секвенирование генома штамма *B. thuriengiensisvar. darmstadiensis 56* и изучение инсектицидной активности биологического препарата на его основе // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. N 1. С. 87–96. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.1.87rus

21. Bejaoui A., Chaabane H., Jemli M., Boulila A., Boussaid M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. glandulosum Desf. at different phenological stages // Journal of Medicinal Food. 2013. Vol. 16. Issue 12. P. 1115–1120. https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079

22. Rodriguez-Garcia I., Silva-Espinoza B.A., Ortega-Ramirez L.A., Leyva J.M., Siddiqui M.W., Cruz-Valenzuela M.R., et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016. Vol. 56. Issue 10. P. 1717–1727. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832

23. Putievsky E., Ravid U., Husain S.Z. Differences in the yield of plant material, essential oils and their main components during the life cycle of *Origanum vulgare* L. // Proseedings of the International Symposium on Essential Oils “Essential oils and aromatic plants” (1984, Noordwijkerhout, Netherlands). Noordwijkerhout, 1984. P. 185–189.

24. Храмов В.А., Агеева Е.М. Колориметрические методы определения содержания свободного пролина и аминоазота в покоящихся семенах пшеницы и их аналитическая активность // Сельскохозяйственная биология.1986. N 10. С. 122–124.

25. Халафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований: монография. М.: Ленард, 2014. 320 с.

26. Taylor W., Camilleri E., Craft D.L., Korza G., Granados M.R., Peterson J., et al. DNA Damage Kills Bacterial Spores and Cells Exposed to 222-Nanometer UV Radiation // Applied and Environmental Microbiology. 2020. Vol. 86. Issue 8. P. e03039-19 (14 p.)

27. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator // Antioxidants. 2020. Vol. 9. Issue 8. P. 681. https://doi.org/10.3390/antiox9080681

REFERENCES

1. Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology.* 1993;21(2):287–295.

2. Adam K, Sviropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata, Lavandula angustifolia* and *Salvia fructinosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1998;46(5):1739–1745.

3. Yoshino K, Higashi N, Koga K. Antioxidant and antiinflammatory activities of oregano extract. *Journal of Health Science.* 2006;52(2):169–173. https://doi.org/10.1248/jhs.52.169

4. Cosge B, Turker A, Ipek I, Gurbuz B. Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart, an endemic species to Turkey. *Molecules.* 2009;14 (5):1702–1712. https://doi.org/10.3390/molecules14 051702

5. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck C, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(2):446–475. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106

6. Habibi E, Shokrzadeh M, Chabra A, Naghshvar F, Keshavarz-Maleki R, Ahmadi A. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology.* 2015;53(1):10–15. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.908399

7. Mohamed NA, Nassier OA. The antihyperglycaemic effect of the aqueous extract of *Origanium vulgare* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2013; 6(1):31–38.

8. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Orescanin-Dusic Z, et al. Methanolic extract of *Origanum vulgare* ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. *British Journal of Nutrition.* 2015;113(5):770–782. https://doi.org/10.1017/ S0007114514004048

9. Chuang L-T, Tsai T-H, Lien T-J, Huang W-C, Liu J-J, Chang H, et al. Ethanolic extract of *Origanum vulgare* suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models. *Molecules.* 2018;23(8):1987. https://doi.org/10.3390/molecules 23081987

10. Ren H, Qin X, Huang B, Fernandez-Garcia V, Lv C. Responses of soil enzyme activities and plant growth in a eucalyptus seedling plantation amended with bacterial fertilizers. *Archives of Microbiology.* 2020;202(6):1381–1396. https://doi.org/ 10.1007/s00203-020-01849-4

11. Mushtaq T, Shah AA, Akram W, Yasin NA. Synergistic ameliorative effect of iron oxide nanoparticles and *Bacillus subtilis* S4 against arsenic toxicity in *Cucurbita moschata*: polyamines, antioxidants, and physiochemical studies. *International Journal of Phytoremediation.* 2020;22(13):1408–1419. https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1781 052

12. Mahmood F, Shahid M, Hussain S, Haider MZ, Shahzad T, Ahmed T, et al. *Bacillus firmus* strain FSS_2C ameliorated oxidative stress in wheat plants induced by azo dye (reactive black-5). *3 Biotech.* 2020;10(2):40. https://doi.org/10.1007/s13205-019-2031-y

13. Khan MA, Asaf S, Khan AL, Jan R, Kang S-M, Kim K-M, et al. Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application. *PLoS ONE.* 2020;15(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232228

14. Yoo S-J, Weon H-Y, Song J, Sang MK. Induced tolerance to salinity stress by halotolerant bacteria *Bacillus aryabhattai* H19-1 and *B. mesonae* H20-5 in tomato plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;29(7):1124–1136. https://doi. org/10.4014/jmb.1904.04026

15. Saad MMG, Kandil M, Mohammed YMM. Isolation and Identification of Plant Growth-Promoting Bacteria Highly Effective in Suppressing Root Rot in Fava Beans. *Current Microbiology*. 2020;77(9):2155–2165. https://doi.org/10.1007/s00 284-020-02015-1

16. Shreya D, Jinal HN, Kartik VP, Amaresan N. Amelioration effect of chromium-tolerant bacteria on growth, physiological properties and chromium mobilization in chickpea (*Cicer arietinum*) under chromium stress. *Archives of Microbiology*. 2020;202(4):887–894. https://doi.org/10.1007/s002 03-019-01801-1

17. Raddadi N, Cherif A, Ouzari HI, Marzorati M, Brusetti L, Boudabous A, et al. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. *Annals of Microbiology*. 2007;57(4):481–494. https://doi.org/10.10 07/bf03175344

18. Makonde HM, Lenga FK, Masiga D, Mugo S, Boga HI. Effects of *Bacillus thuringiensis* CRY1A(c) d-endotoxin on growth, nodulation and productivity of beans [*Phaseolus vulgaris* (L.) and siratro (*Macroptilium atropurpureum* DC.)]. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(1):017–024.

19. Azizoglu U. Bacillus thuringiensis as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current Microbiology.* 2019;76(11):1379–1385. https: //doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9

20. Belousova ME, Grishechkina SD, Ermolova VP, Antonets KS, Mardanov AV, Rakitin AL, et al. Whole genome sequencing of *bacillus thuringiensis* var*. darmstadiensis* 56 strain and the study of insec-

ticidal activity of the biological preparation on its basis. *Sel'skohozyaistvennaya biologiya = Agricultural Biology.* 2020;55(1):87–96. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.1.87rus (In Russian)

21. Bejaoui A, Chaabane H, Jemli M, Boulila A, Boussaid M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. glandulosum Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*. 2013;16(12):1115–1120. https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079

22. Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz-Valenzuela MR., et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(10):1717–1727. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832

23. Putievsky E, Ravid U, Husain SZ. Differences in the yield of plant material, essential oils and their main components during the life cycle of *Origanum vulgare* L. In: *Essential oils and aromatic plants: Proseedings of the International Symposium on Essential Oils,* 1984, Noordwijkerhout, Netherlands. Noordwijkerhout; 1984. p. 185–189.

24. Khramov VA, Ageeva EM. Colorimetric methods for determining the content of free proline and amino nitrogen in dormant wheat seeds and their analytical activity. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya.*1986;10:122–124.(In Russian)

25. Khalafyan AA. *Modern statistical methods in medical research*. Moscow: Lenard, 2014, 320 p. (In Russian)

26. Taylor W, Camilleri E, Craft DL, Korza G, Granados MR, Peterson J, et al. DNA Damage Kills Bacterial Spores and Cells Exposed to 222-Nanometer UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(8):e03039-19 (14 p.)

27. Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants.* 2020; 9(8):681. https://doi.org/10.3390/antiox9080681

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Крыжко Анастасия Владимировна,
к.с-х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, протеомики и биоинформатики в сельском хозяйстве,
Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация,
✉ e-mail: solanum@ukr.net

Буджурова Урьяне Меметовна.,
лаборант лаборатории молекулярной и клеточной биологи,
Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма,
295453, г. Симферополь, ул. Киевская, 150,
Российская Федерация
e-mail: ubudzhurova@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiia V. Kryzhko,
Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher,
Laboratory of Molecular Genetics, Proteomics and Bioinformatics in Agriculture
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
✉ e-mail: solanum@ukr.net

Uryane M. Budzhurova,
Laboratory Assistant,
Laboratory of Molecular and Cellular Biology,
Research Institute of Agriculture of Crimea,
150, Kievskaya St., Simferopol, 295453,
Russian Federation,
e-mail: ubudzhurova@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Оба автора сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Статья поступила в редакцию 08.09.2020; одобрена после рецензирования 22.10.2020; принята к публикации 30.11.2020.

The article was submitted 08.09.2020; approved after reviewing 22.10.2020; accepted for publication 30.11.2020.