

Оригинальная статья / Original article

УДК 57.013:57.014

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-708-718>



## Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде с мелассой

© Т.З. Ха\*, А.В. Канарский\*, З.А. Канарская\*, А.В. Щербаков\*\*,  
Е.Н. Щербакова\*\*

\*Казанский национальный исследовательский технологический университет,  
г. Казань, Республика Татарстан, Россия

\*\*ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия

**Резюме:** Бактериальные экзополисахариды с влагоудерживающими и цементирующими свойствами играют очень важную роль в формировании и стабилизации почвенных агрегатов, регулировании питательных веществ и потока воды через корни растений, снижении солевого стресса в растениях. При внесении в почву бактерий, продуцирующих экзополисахариды, растения более устойчивы к водному стрессу благодаря улучшению структуры и значительному накоплению пролина, сахаров и свободных аминокислот в условиях дефицита воды. Целью настоящей работы являлось определение эффективности биосинтеза экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* при культивировании на питательной среде, приготовленной на основе мелассы. В экспериментах использованы продуценты экзополисахаридов – штаммы бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574, предоставленные Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург). Для определения влияния условий культивирования на синтез экзополисахаридов бактериями *P. mucilaginosus* применен метод «один фактор за один раз» (one-factor-at-a-time – OFAT). По результатам исследований выбраны наиболее эффективный продуцент экзополисахаридов, возраст и дозы инокулята, оптимальные значения температуры культивирования и pH среды, источник азота и его концентрации, а также определены условия аэрации, влияющие на биосинтез экзополисахаридов и рост выбранного штамма бактерий *P. mucilaginosus*. Установлено, что наиболее эффективным продуцентом экзополисахаридов является штамм *P. mucilaginosus* 574. Показано, что для биосинтеза экзополисахаридов культивирование данного штамма целесообразно и экономично проводить на питательной среде с 2% мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. Максимальное количество экзополисахаридов может достигать 9,55 г/л в питательной среде с 2% мелассы объемом 50 мл с добавлением 0,1% кукурузного экстракта как индуктора синтеза экзополисахаридов при температуре культивирования  $30 \pm 1$  °C, pH среды  $6,0 \pm 0,2$  с внесением 5% инокулята после 24 ч. инокуляции. Полученные результаты исследований рекомендуется использовать при создании технологии производства микробиологических удобрений.

**Ключевые слова:** меласса, *Paenibacillus mucilaginosus*, экзополисахариды, условия культивирования

**Для цитирования:** Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Биосинтез экзополисахаридов почвенными бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде с мелассой. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. N 4. С. 708–718. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-708-718>

## Biosynthesis of exopolysaccharides by soil bacteria *Paenibacillus mucilaginosus* on a nutrient molasses medium

Dung T. Ha\*, Albert V. Kanarsky\*, Zosia A. Kanarskaya\*, Andrei V. Shcherbakov\*\*,  
Elena N. Shcherbakova\*\*

\* Kazan National Research Technological University, Russian Federation

\*\* All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology,  
St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract:** Bacterial exopolysaccharides exhibiting water-retaining and cementing properties play an essential role in such processes as the formation and stabilization of soil aggregates, regulation of nutrients and

water flow through plant roots, as well as reduction of salt stress in plants. When bacteria producing exopolysaccharides are introduced into a soil, plants become more resistant to water stress due to improved structure and significant accumulation of proline, sugars and free amino acids under the conditions of water deficiency. In this work, we set out to determine the efficiency of exopolysaccharide biosynthesis by the soil bacteria *Paenibacillus mucilaginosus* when cultivated on a nutrient molasses medium. The bacterial strains *P. mucilaginosus* 560 and 574 provided by the Departmental collection of non-pathogenic microorganisms for agricultural purposes (All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg) were used as exopolysaccharide producers. In order to determine the influence of cultivation conditions on the synthesis of exopolysaccharides by *P. mucilaginosus*, the one-factor-at-a-time (OFAT) method was used. On the basis of the obtained results, we determined the most effective producer of exopolysaccharides, the age and dose of the inoculum, the optimal values of the cultivation temperature and medium pH, the source of nitrogen and its concentration, as well as the aeration conditions affecting exopolysaccharide biosynthesis and the growth of the selected bacterial strain *P. mucilaginosus*. It was established that the *P. mucilaginosus* 574 strain is the most effective producer of exopolysaccharides. It was shown that the biosynthesis of exopolysaccharides is most effective and economical upon the cultivation of *P. mucilaginosus* 574 on a nutrient medium containing 2% molasses without addition of minerals and nitrogen. The maximum amount of exopolysaccharides can reach 9.55 g/L on a nutrient medium containing 2% molasses at a volume of 50 ml with the addition of 0.1% corn extract as an inducer of exopolysaccharide synthesis at a cultivation temperature of  $30 \pm 1$  °C, a medium pH of  $6.0 \pm 0.2$  with the introduction of 5% inoculum after 24 hours of inoculation. The obtained research results are recommended for use when creating new technologies for the production of microbiological fertilizers.

**Keywords:** molasses, *Paenibacillus mucilaginosus*, exopolysaccharides, cultivation conditions

**For citation:** Ha TD, Kanarsky AV, Kanarskaya ZA, Scherbakov AV, Shcherbakova EN. Biosynthesis of exopolysaccharides by soil bacteria *Paenibacillus mucilaginosus* on a nutrient molasses medium. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(4):708–718. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-4-708-718>

## ВВЕДЕНИЕ

На глазах современных людей происходит изменение климата, что приводит к глобальному потеплению и сопровождается снижением количества выпадающих осадков, и, соответственно, увеличивается площадь орошаемых посевных угодий [1]. Как правило, почвы, богатые множеством питательных веществ, имеют не благоприятную для растений структуру, плохо удерживают воду и питательные вещества, быстро высыхают, при этом питательные вещества в этих почвах находятся в недоступной форме для растения. Применение известных агротехнических методов обработки подобной почвы, в том числе орошение и внесение минеральных удобрений, не дает положительных результатов, является экономически неэффективным и даже экологически опасным.

В складывающейся ситуации использования сельскохозяйственных угодий в связи с необходимостью соблюдения экологической безопасности при воспроизводстве сельскохозяйственных культур для повышения плодородия и урожайности почвы все чаще вместо минеральных удобрений применяются бактериальные препараты, изготавливаемые на основе различных штаммов микроорганизмов или их метаболитов, известных как ризобактерии, способствующих росту растений (plant growth-promoting rhizobacteria – PGPR). Ризобактерии улучшают рост корней, тем самым повышают доступность микроэлементов к корням растений [2]. Кроме того, PGPR повышают

эффективность использования воды и увеличивают водопоглощающую способность корней в условиях дефицита воды [3].

Продукты метаболизма ризобактерий также влияют на физиологические процессы в растениях [4]. В частности, экзополисахариды (ЭПС), выделяемые бактериями, оказывают существенное влияние на различные свойства почвы и урожайность растений. Продуцентами ЭПС являются ризобактерии видов *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Paenibacillus* и др. [5–8]. ЭПС обладают уникальными влагоудерживающими и цементирующими свойствами, поэтому они играют жизненно важную роль в формировании и стабилизации почвенных агрегатов, регулировании питательных веществ и потока воды через корни растений [9, 10]. Более того, ЭПС обеспечивают усвоение питательных веществ растением и последующее увеличение роста растений. Отмечено, что ЭПС замедляют диффузию кислорода в клетку и, соответственно, защищают нитрогеназу в условиях кислородного стресса, а также участвуют во взаимодействии бактерий с растениями [11, 12]. Бактериальные ЭПС помогают снизить солевой стресс в растениях благодаря связыванию ионов  $\text{Na}^+$  в корнях, при этом накопление в растениях ионов  $\text{Na}^+$  уменьшается [13]. При внесении в почву бактерий, продуцирующих ЭПС, растения больше накапливают пролина, сахаров и свободных аминокислот в условиях дефицита воды [14]. Показано, что внесение в почву бактерий *Azospirillum*, синтезирующих

ЭПС, растения более устойчивы к водному стрессу благодаря улучшению структуры и благоприятному для растений агрегатному состоянию почвы [15].

Факторами, которые потенциально могут влиять на синтез ЭПС бактериями, являются состав питательной среды, особенно источники углерода и азота, а также такие параметры, как pH, температура и время инкубации.

Целью настоящей работы являлось определение эффективности биосинтеза ЭПС почвенными бактериями *P. mucilaginosus* при культивировании на питательной среде, приготовленной из мелассы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штаммы бактерий *Paenibacillus mucilaginosus* 560 и 574, предоставленные Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург).

Для определения перспективного штамма из взятых культур проводили глубинное культивирование обоих штаммов бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде Александрова следующего состава, %: меласса – 2; NaCl – 0,02;  $K_2HPO_4$  – 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,05;  $CaCO_3$  – 0,01 [16]. Питательную среду стерилизовали в автоклаве при температуре  $120 \pm 1$  °C и избыточном давлении 1 атм в течение 20 мин. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера 250 мл объемом среды 100 мл при температуре  $30 \pm 1$  °C и непрерывном перемешивании со скоростью 200 об./мин на шейкере инкубатора ES-20 в течение 3-х суток.

Для определения влияния условий культивирования (концентрации субстрата, pH среды, температуры, источника азота, его концентрации, возраста и дозы посевного материала, аэрации) на рост и продуктивность ЭПС, синтезируемых бактериями *P. mucilaginosus*, использовали метод «один фактор за один раз» (one-factor-at-a-time – OFAT). Метод основан на варьировании одного фактора в то время как другие переменные факторы фиксируются [17].

В качестве источника углерода использовали мелассу, содержание которой в питательной среде варьировалось от 1 до 4%. Для определения влияния pH среды проводили корректировку питательной среды, приготовленной из мелассы, гидроксидом калия от 6 до 9. При инкубировании варьировали температуру от 25 до 35 °C.

В качестве источника азота использовали неорганические вещества ( $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ), органические источники азота (дрожжевой экстракт, пептон, бетафин, кукурузный экстракт, карбамид), концентрация которых в питательной среде составляла 0,1%. Концентрация наилучшего источника азота в питательной среде варьировалась: 0,02; 0,1; 0,2; 0,3 и 0,4%. Контроль-

ный опыт проводили без внесения в среду азотсодержащих веществ.

Посевной материал готовили в колбах инкубированием в течение 12, 24, 36, 48 ч и задавали в дозах 2, 5, 7, 10%.

Для определения влияния аэрации в колбы вместимостью 250 мл задавали питательную среду начальным объемом 50, 100, 150 мл, что соответствует отношению объема воздуха к объему среды 4:1; 1,5:1; 0,67:1 соответственно.

Рост исследуемых бактерий оценивали по таким критериям, как удельная скорость роста, время генерации и выход биомассы и ЭПС, которые рассчитывали согласно методике, рекомендованной в работе [18]. Количество биомассы бактерий определяли гравиметрическим методом после высушивания на влагомере «МХ-50». Синтез ЭПС оценивали косвенно по значению вязкости культуральной жидкости, которая определялась на вискозиметре Vibro SV-10A. Количество ЭПС определяли гравиметрическим методом, для этого ЭПС выделяли и очищали осаждением трехкратным объемом изопропанола с дальнейшим центрифугированием и высушиванием.

В супернатанте после 72 ч глубинного культивирования бактерий *P. mucilaginosus* определяли активность  $\beta$ -фруктофуранозидазы методом, изложенным в работе [19]. Остаточное содержание редуцирующих веществ (РВ) в супернатанте определяли с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты после гидролиза не усвоенных бактериями углеводов концентрированной серной кислотой с соотношением 1:1, методика определения которого приведена в работе [20].

Эксперименты проводили в трех биологических и аналитических повторностях, полученные результаты статистически обрабатывались с использованием стандартного пакета программы Excel 2010 и программы Prism 7.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Экспериментально установлено, что самыми перспективными продуцентами с высоким выходом биомассы и ЭПС при культивировании на питательной среде, содержащей сахарозу, являлись штаммы бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 [21, 22]. Для получения более дешевой и эффективной питательной среды вместо коммерческих сахаров был выбран отход сахарного производства – меласса, как один из наиболее доступных, эффективных углеродных субстратов. Преимуществами мелассы являются ее низкая стоимость, простота хранения. Помимо значительной доли сахара в ней содержатся различные соли, микроэлементы, аминокислоты и витамины, которые обеспечивают рост микроорганизмов [23].

В таблице показано, что с сопоставимыми

Ростовые параметры, количество биомассы и ЭПС двух штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 при культивировании на питательной среде, содержащей 2% мелассы

Growth parameters, biomass and EPSs of two strains *P. mucilaginosus* 560 and *P. mucilaginosus* 574 when cultivated on nutrient medium containing 2% molasses

Показатель	<i>P. mucilaginosus</i> 560	<i>P. mucilaginosus</i> 574
Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	0,13±0,03	0,12±0,03
Время генерации, ч	5,37±1,33	5,84±1,60
Количество биомассы, г/л	0,85±0,02	1,71±0,03
Количество ЭПС, г/л	4,20±0,13	5,02±0,15
Активность β-фруктофуранозидазы, ед./мл	0,33±0,01	0,84±0,01

значениями времени генерации и удельной скорости роста количества биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 574, соответственно в 2 и 1,2 раза больше по сравнению с количеством биомассы и ЭПС, синтезируемых штаммом *P. mucilaginosus* 560. Это может быть связано со способностью синтеза продуцентом фермента β-фруктофуранозидазы, гидролизующей сахарозу в мелассе, и усвоением субстрата индивидуальными штаммами. Это подтверждается и более высокой активностью β-фруктофуранозидазы штамма *P. mucilaginosus* 574.

Следует отметить, что в первые 48 ч культивирования обоих рассматриваемых штаммов бактерий *P. mucilaginosus* происходит изменение рН среды в сторону подкисления среды из-за накопления органических кислот в ней. К концу культивирования штамма *P. mucilaginosus* 560 наблюдается незначительное повышение рН среды – от 5,7 до 6,0. При этом рН среды интенсивно поднимается – от 5,6 до 6,9 – при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574. Увеличение рН среды может быть обусловлено изменением состава органических и неорганических веществ, присутствующих в мелассе, которые ассимилируются бактериями, а также продуктами метаболизма, синтезируемыми этими бактериями при культивировании [23] (рис. 1).

Полученные результаты исследований показали, что штамм *P. mucilaginosus* 574 при культивировании на питательной среде из мелассы является более перспективным продуцентом ЭПС с высоким выходом биомассы.

Известно, что концентрация субстрата является одним из лимитирующих факторов роста микроорганизмов. В настоящем исследовании определялось влияние концентрации мелассы на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574. На рис. 2, а показана зависимость удельной скорости роста штамма *P. mucilaginosus* 574 от концентрации мелассы в среде. Отмечено, что максимальная удельная скорость роста исследуемого штамма достигает  $\mu_{\text{max}} = 0,12 \text{ ч}^{-1}$  при концентрации мелассы 1% и в дальнейшем незначительно снижается в рассматриваемом диапазоне концентрации мелассы.

Кроме того, отмечено, что с повышением содержания мелассы в среде количество биомассы увеличивается. Максимальное количество био-

массы достигало 4 г/л при культивировании штамма *P. mucilaginosus* 574 на питательной среде с 4% мелассы. Однако максимальное количество ЭПС (5,0 г/л), соответственно максимальная вязкость культуральной жидкости, наблюдалось при культивировании на среде с 2% мелассы. Содержание мелассы выше 2% в среде ингибирует синтез ЭПС (рис. 2, б). Полученные результаты сопоставимы с данными, приведенными в работах [24, 25], где установлено, что содержание 2% мелассы в питательной среде является оптимальным для синтеза ЭПС бактериями *Azotobacter* с получением 7,5 г/л ЭПС, *Bacillus subtilis* – с получением 4,86 г/л ЭПС.

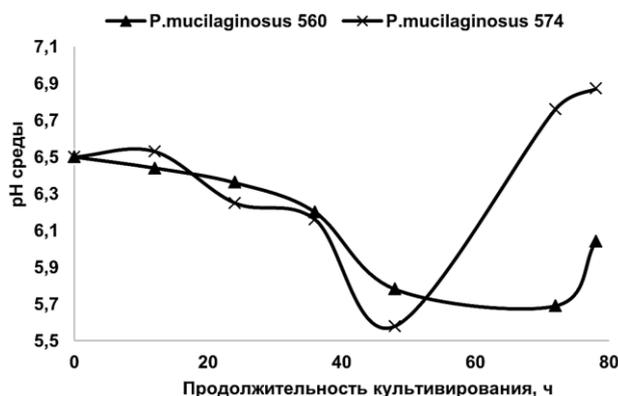


Рис. 1. Изменение рН среды при культивировании штаммов бактерий *P. mucilaginosus* 560 и 574 на питательной среде с 2% мелассы при температуре  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  и непрерывном перемешивании со скоростью 200 об./мин на шейкере инкубатора ES-20 в течение 3 суток

Fig. 1. Medium pH change during cultivation of two strains of bacteria *P. mucilaginosus* 560 and 574 on nutrient medium with 2% molasses at temperature  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  and continuous stirring at speed of 200 rpm on incubator shaker ES-20 for 3 days

Определение влияния температуры на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 проводили на питательной среде с 2% мелассы. Температуру культивирования варьировали в диапазоне от 25 до 35 ° с интервалом 5 °.

Установлено, что оптимальной для синтеза ЭПС является температура 30 °C, на что указывает высокая вязкость культуральной жидкости.

Эта температура способствует и лучшему росту исследуемых бактерий. При повышении температуры культивирования до 35 °С происходит снижение синтеза биомассы в 2,3 раз, а ЭПС – в 8,6 раз по сравнению с оптимальной температурой культивирования 30 °С. Аналогично, при снижении температуры культивирования до 25 °С синтез биомассы уменьшается в 1,7 раз, ЭПС – в 1,9 раза по сравнению с оптимальной температурой культивирования (рис. 3, а).

Кроме температуры на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 также существенно влияет рН среды. Исследование проводилось при оптимальной температуре при корректировке рН среды с гидроксидом кальция от 6 до 9. В качестве контроля использовали питательную среду без корректировки рН среды со значением 6,0±0,2. Показано, что при рН = 9 рост рассмат-

риваемых штаммов не наблюдается. В диапазоне рН от 6 до 8 штамм *P. mucilaginosus* 574 эффективно растет при культивировании на питательной среде из мелассы при нейтральном значении рН = 7. Однако эффективный синтез ЭПС происходил под действием стрессовых факторов при изменении рН среды в более кислую или щелочную среду. В частности, максимальное количество ЭПС накапливалось в слабокислой питательной среде при рН = 6 (рис. 3, б).

При оптимальных условиях культивирования ( $T = 30\text{ °C}$ ,  $\text{pH} = 6,0 \pm 0,2$ ) проводили определение влияния источника азота и его концентрации на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574 (рис. 4). В качестве источников азота были выбраны как минеральные соли, так и органические вещества.

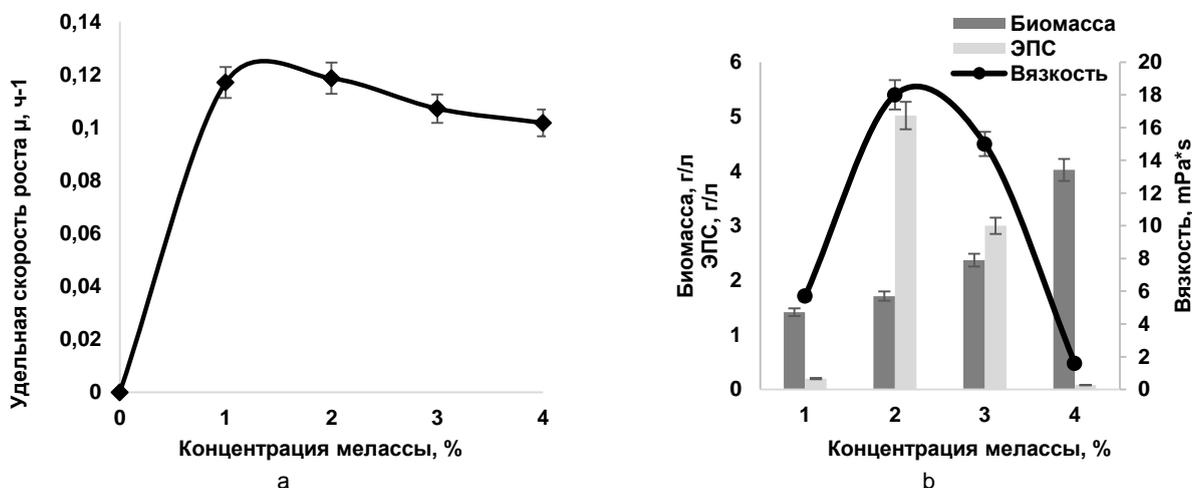


Рис. 2. Влияние концентрации мелассы в питательной среде на кинетику роста (а) и синтез продуктов метаболизма (б) штаммом 574 бактерий *P. mucilaginosus*

Fig. 2. Influence of molasses concentration in the nutrient medium on the growth kinetics (a) and the productivity of metabolic products (b) of strain *P. mucilaginosus* 574

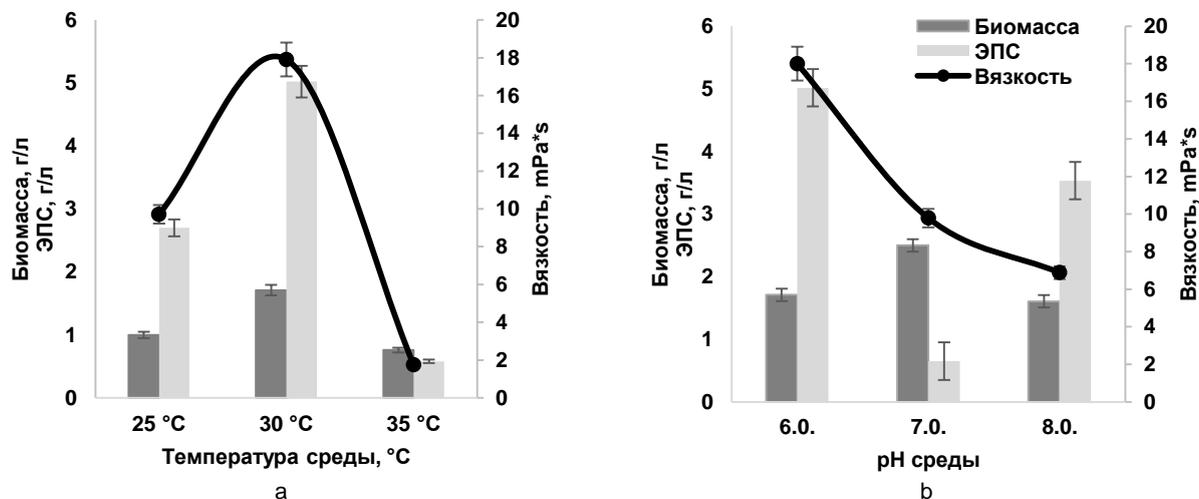
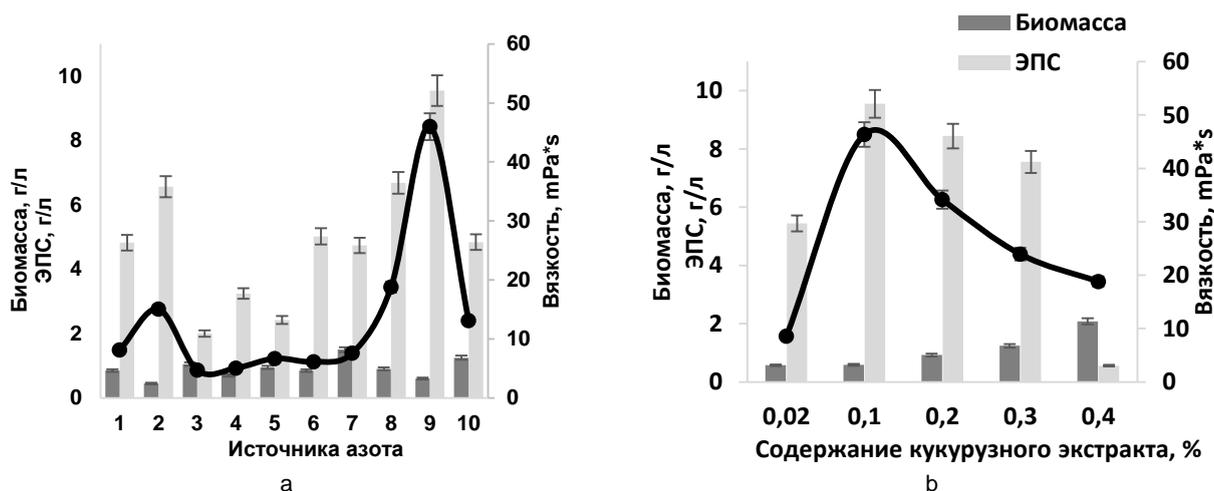


Рис. 3. Влияние температуры культивирования (а) и рН среды (б) на рост и синтез ЭПС штаммом *P. mucilaginosus* 574

Fig. 3. Influence of the cultivation temperature (a) and medium pH (b) on the growth and synthesis of EPS by strain *P. mucilaginosus* 574



**Рис. 4.** Влияние источника азота (а) и его содержания (b) на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574. На рис. 4, а: 1 – без источника азота; 2 – без источников минеральных солей и азота; 3 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 4 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5 – дрожжевой экстракт; 6 – одновременное присутствие  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и дрожжевого экстракта; 7 – пептон; 8 – бетафин; 9 – кукурузный экстракт; 10 – карбамид

**Fig. 4.** Influence of the nitrogen sources (a) and its' concentration (b) on the biomass and EPS synthesis by strain 574 *P. mucilaginosus*. In fig. 4, a:

1 – without nitrogen sources; 2 – without mineral salts and nitrogen sources; 3 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 4 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5 – yeast extract; 6 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and yeast extract mixture; 7 – peptone; 8 – betafin; 9 – corn extract; 10 – carbamide

Наблюдается интенсивность синтеза ЭПС рассматриваемым штаммом при культивировании на питательной среде, приготовленной из мелассы без дополнительных источников минеральных солей и азота (среда 2, рис. 4, а), поскольку в стрессовых условиях (при избытке сахарозы и недостаточном количестве азота) синтез ЭПС стимулируется. Следовательно, содержание питательных веществ в мелассе является достаточным для нормальной жизнедеятельности и синтеза ЭПС исследуемого штамма бактерии. Дополнительное внесение источника азота в питательную среду существенно влияет на рост исследуемого штамма бактерии по сравнению с контролем (среда 1, рис. 4, а). Наилучшим источником азота для синтеза биомассы служил пептон, который способствовал увеличению количества биомассы в 2 раза по сравнению с контролем (среда 1).

Из результатов, представленных на рис. 4, видно, что внесение в среду бетафина и кукурузного экстракта способствует синтезу ЭПС штаммом 574 *P. mucilaginosus*. Это, возможно, связано с содержанием в бетафине и кукурузном экстракте углеводов, которые стимулируют синтез ЭПС. Максимальная концентрация синтезируемых ЭПС достигала 9,55 г/л при внесении в среду кукурузного экстракта в количестве 0,1%, что в 2 раза больше по сравнению с контролем (см. среда 1, рис. 4, а) и в 1,5 раза больше при культивировании исследуемого штамма на среде, содержащей 2% мелассы и без дополнительных источников минеральных солей и азота (среда 2, рис. 4, а). По-видимому, это связано с содержа-

нием в кукурузном экстракте индукторов синтеза ЭПС. При дальнейшем повышении содержания кукурузного экстракта в среде создаются благоприятные условия для роста продуцента, в результате которого количество биомассы увеличивается, а синтез ЭПС снижается (рис. 4, b). Ранее также было установлено, что кукурузный экстракт является наиболее благоприятным источником азота для биосинтеза ЭПС бактериями *Bacillus megaterium* [26], дрожжами *Aureobasidium pullulans* RBF 4A3 [27] и грибами *Agaricus nevoi*, *Inonotus levis* HAI 796 и *Phellinus robustus* [28].

Исследовано влияние возраста и дозы инокулята на синтез биомассы и ЭПС рассматриваемого штамма (рис. 5). Установлено, что с увеличением возраста инокулята количество биомассы исследуемым штаммом повышается, при этом количество синтезируемых ЭПС снижается (рис. 5, а). Отмечено незаметное влияние дозы инокулята на синтез биомассы штаммом *P. mucilaginosus* 574. Максимальная концентрация ЭПС (9 г/л) и биомассы (0,4 г/л) наблюдалась при возрасте инокулята 24 ч (начальная лог-фаза, рис. 5, а) с внесением 5% инокулята (рис. 5, b).

При исследовании влияния аэрации на продуктивность штамма *P. mucilaginosus* 574 показано, что максимальное количество биомассы (2 г/л) и ЭПС (9,6 г/л), синтезируемых продуцентом *P. mucilaginosus* 574, наблюдается в условиях аэрации, при которых отношение объема воздуха к объему среды составляет 4:1 (рис. 6, а). Полученные результаты соответствуют результа-

там культивирования штаммом *Paenibacillus* sp. TKU023 [29]. Обнаружено, что в условиях интенсивной аэрации бактерии рода *Paenibacillus* быстро растут и синтезируют значительное количество метаболитов. При этом количество биомассы и ЭПС при соотношении объема воздуха к объему среды 4:1 соответственно в 2,6 и 6,6 раза больше по сравнению с соотношением объема воздуха к объему среды 1,5:1 и 0,67:1.

В связи с улучшением условий аэрации в среде рассматриваемый штамм может утилизи-

ровать до 96% углеводов мелассы. Ухудшение утилизации субстрата при снижении отношения объема воздуха к объему среды может быть связано с недостатком растворенного в среде кислорода или недостаточной аэрацией для полной утилизации углеводов мелассы. Вследствие полной утилизации сахара при соотношении объема воздуха к объему среды 4:1 число клеток достигает  $6 \cdot 10^8$  КОЕ/мл и синтез ЭПС увеличивается до 9,55 г/л (рис. 6, b).

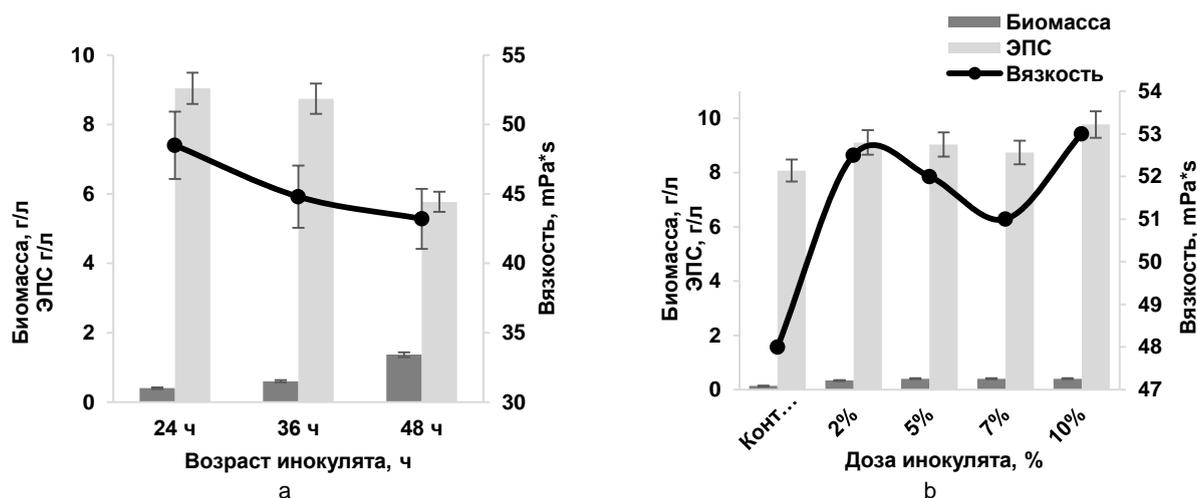


Рис. 5. Влияние возраста инокулята (а) и его дозы (b):  
 1 – без инокулята (контроль); 2 – 2% инокулята; 3 – 5% инокулята; 4 – 7% инокулята;  
 5 – 10% инокулята на синтез биомассы и ЭПС штамма *P. mucilaginosus* 574

Fig. 5. Influence of inoculum age (a) and inoculum dosage (b):  
 1 – without inoculum; 2 – 2% inoculum; 3 – 5% inoculum; 4 – 7% inoculum;  
 5 – 10% inoculum on the biomass and EPS synthesis of strain *P. mucilaginosus* 574

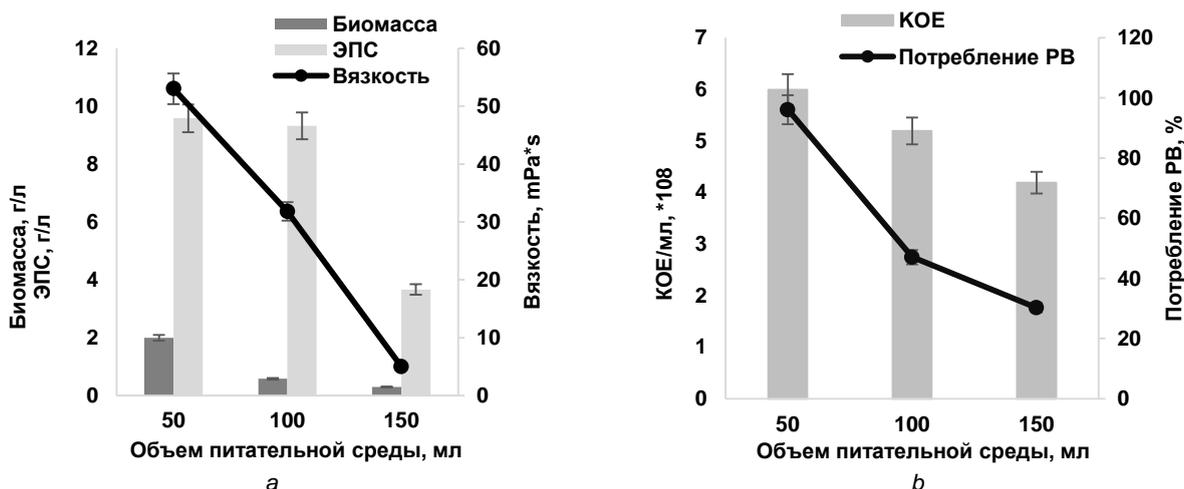


Рис. 6. Зависимость синтезируемых биомассы и ЭПС (а), числа колониеобразующих единиц и потребления субстрата РВ (b) штамма *P. mucilaginosus* 574 от отношения объема воздуха к объему среды

Fig. 6. Relationship between synthesized biomass and EPS (a), colony-forming units number and reducing sugars consumption (b) of strain *P. mucilaginosus* 574 and ratio of air volume with nutrient medium volume

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что эффективным продуцентом экзополисахаридов при культивировании на

питательной среде из мелассы является штамм *P. mucilaginosus* 574.

2. Показано, что эффективный синтез ЭПС

штаммом *P. mucilaginosus* 574 проходит на питательной среде из мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота. Это указывает на экономическую целесообразность использования мелассы без дополнительного внесения минеральных веществ и азота для культивирования *P. mucilaginosus* 574.

3. Выявлено, что для биосинтеза ЭПС культивирование штаммом *P. mucilaginosus* 574 целесообразно проводить на питательной среде, содержащей 2% мелассы при температуре куль-

тивирования  $30 \pm 1$  °C и pH среды, равной  $6,0 \pm 0,2$ , с добавлением 0,1% кукурузного экстракта в качестве индуктора. Максимальная концентрация ЭПС, которая была получена с внесением 5% инокулята после 24 ч инокуляции при отношении объема воздуха к объему среды 4:1, составила 9,55 г/л.

Результаты проведенных исследований рекомендуют использовать при создании технологии производства микробиологических удобрений.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Khan N., Bano A., Rahman M.A., Rathinasapathi B., Babar M.A. UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long-term drought stress // *Plant, Cell & Environment*. 2019. Vol. 42. Issue 1. P. 115–132. <https://doi.org/10.1111/pce.13195>
2. Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Boyce A.N. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review // *Molecules*. 2016. Vol. 21. Issue 5. P. 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
3. Sade N., Gebretsadik M., Seligmann R., Schwartz A., Wallach R., Moshelion M. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress // *Plant Physiology*. 2010. Vol. 152. Issue 1. P. 245–254. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145854>
4. Kloeppel J.W., Rodriguez-Kabana R., Zehnder A.W., Murphy J.F., Sikora E., Fernandez C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases // *Australasian Plant Pathology*. 1999. Vol. 28. Issue 1. P. 21–26. <https://doi.org/10.1071/AP99003>
5. Hilliou L., Freitas F., Oliveira R., Reis M.A.M., Lespineux D., Grandfils C., et al. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as single carbon source // *Carbohydrate Polymers*. 2009. Vol. 78. Issue 3. P. 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.011>
6. Rottava I., Batesini G., Silva F.M., Lerin L., de Oliveira D., Padilha F.F., et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. // *Carbohydrate Polymers*. 2009. Vol. 77. Issue 1. P. 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.001>
7. Freitas F., Alves V.D., Pais J., Carvalheira M., Costa N., Oliveira R., et al. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol // *Process Biochemistry*. 2010. Vol. 45. Issue 3. P. 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.020>
8. Liang T.-W., Wang S.-L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities // *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13. Issue 4. P. 1847–1863. <https://doi.org/10.3390/md13041847>
9. Roberson E.B., Firestone M.K. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. // *Applied and Environmental Microbiology*. 1992. Vol. 58. Issue 4. P. 1284–1291. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.4.1284-1291.1992>
10. Tisdall J.M., Oades J.M. Organic matter and water stable aggregates in soils // *European Journal of Soil Science*. 1982. Vol. 33. Issue 2. P. 141–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x>
11. Sabra W., Zeng A.P., Lünsdorf H., Deckwer W.D. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase // *Applied and environmental microbiology*. 2000. Vol. 66. Issue 9. P. 4037–4044. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.4037-4044.2000>
12. Leigh J.A., Coplin D.L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions // *Annual Review of Microbiology*. 1992. Vol. 46. P. 307–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.001515>
13. Ashraf M. Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress // *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2004. Vol. 78. Issue 2. P. 91–96.
14. Naseem H., Ahsan M., Shahid M.A., Khan N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance // *Journal of Basic Microbiology*. 2018. Vol. 58. Issue 12. P. 1009–22. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
15. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // *Canadian Journal of Microbiology*. 2004. Vol. 50. Issue 8. P. 521–577. <https://doi.org/10.1139/W04-035>
16. Li X., Yang S.H., Yu X.C., Jin Z.X., Li W.D., Li L., et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion // *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. Issue 4. P. 878–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02683.x>
17. Czitrom V. One-factor-at-a-time versus designed experiments // *The American Statistician*. 1999. Vol. 53. Issue 2. P. 126–131. <https://doi.org/>

10.1080/00031305.1999.10474445

18. Maier R.M. Bacterial Growth. In: Maier R.M., Pepper I.I., Gerba C.P. Environmental Microbiology. San Diego, CA: Academic Press; 2000. Chapter 3. p. 43–60.

19. Barley M.J., Biely P., Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity // Journal of Biotechnology. 1992. Vol. 23. Issue 3. P. 257–270.

20. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимова Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. N 19. С. 120–122.

21. Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. 2019. N 3. С. 62–72. <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72>

22. Ха Т.З., Канарская З.А., Канарский А.В., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Влияние источника углерода на синтез биомассы и экзополисахаридов бактериями *Paenibacillus mucilaginosus* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9. N 3. С. 509–518. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518>

23. Яровенко В.Л., Маринченко В.А., Смирнов В.А., Устинников Б.А., Цыганков П.С., Швец В.Н. [и др.]. Технология спирта. М.: Колос-Пресс, 2002. 464 с.

24. Emtiazia G., Ethemadifara Z., Habib M.H. Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer // African Journal of Biotechnology. 2004. Vol. 3. Issue 6. P. 330–333. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2060>

25. Razack S.A., Velayutham V., Thangavelu V. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes // Turkish Journal of Biology. 2013. Vol. 3. Issue 37. P. 280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>

26. Chaijamrus S., Udpuay N. Production and Characterisation of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. X p. 1–12, 2008.

27. Sharma N., Prasad G.S., Choudhury A.R. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide // Carbohydrate Polymers. 2013. Vol. 93. Issue 1. P. 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.059>

28. Elisashvili V.I., Kachlishvili E.T., Wasser S.P. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production // Applied Biochemistry and Microbiology. 2009. Vol. 45. Issue 5. P. 531–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>

29. Wang C.-L., Huang T.-H., Liang T.-W., Fang C.-Y., Wang S.-L. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023 // New Biotechnology. 2011. Vol. 28. Issue 6. P. 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.003>

## REFERENCES

1. Khan N, Bano A, Rahman MA, Rathinasabapathi B, Babar MA. UPLC-HRMS-based untargeted metabolic profiling reveals changes in chickpea (*Cicer arietinum*) metabolome following long-term drought stress. *Plant, Cell & Environment*. 2019;42(1):115–132. <https://doi.org/10.1111/pce.13195>

2. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Boyce AN. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. *Molecules*. 2016;21(5):573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

3. Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, Schwartz A, Wallach R, Moshelion M. The role of tobacco Aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiology*. 2010;152(1):245–254. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145854>

4. Kloeppel JW, Rodriguez-Kabana R, Zehnder AW, Murphy JF, Sikora E, Fernandez C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soil-borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*. 1999;28(1):21–26. <https://doi.org/10.1071/AP99003>

5. Hilliou L, Freitas F, Oliveira R, Reis MAM, Lespineux D, Grandfils C, et al. Solution properties

of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as single carbon source. *Carbohydrate Polymers*. 2009;78(3):526–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.011>

6. Rottava I, Batesini G, Silva FM, Lerin L, de Oliveira D, Padilha FF, et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*. 2009;77(1):65–71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.001>

7. Freitas F, Alves VD, Pais J, Carvalheira M, Costa N, Oliveira R, et al. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. *Process Biochemistry*. 2010;45(3):297–305. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.020>

8. Liang T-W, Wang S-L. Recent advances in exopolysaccharides from *Paenibacillus* spp.: production, isolation, structure, and bioactivities. *Marine Drugs*. 2015;13(4):1847–1863. <https://doi.org/10.3390/md13041847>

9. Roberson EB, Firestone MK. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(4):1284–1291.

<https://doi.org/10.1128/AEM.58.4.1284-1291.1992>

10. Tisdall JM, Oades JM. Organic matter and water stable aggregates in soils. *European Journal of Soil Science*. 1982;33(2):141–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1982.tb01755.x>

11. Sabra W, Zeng AP, Lünsdorf H, Deckwer WD. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(9):4037–4044. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.4037-4044.2000>

12. Leigh JA, Coplin DL. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*. 1992;46:307–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.001515>

13. Ashraf M. Photosynthetic capacity and ion accumulation in a medicinal plant henbane (*Hyoscyamus niger* L.) under salt stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2004;78(2):91–96.

14. Naseem H, Ahsan M, Shahid MA, Khan N. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology*. 2018;58(12):1009–22. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>

15. Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 2004;50(8):521–577. <https://doi.org/10.1139/W04-035>

16. Li X, Yang SH, Yu XC, Jin ZX, Li WD, Li L, et al. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion // *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. Issue 4. P. 878–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02683.x>

17. Czitrom V. One-factor-at-a-time versus designed experiments. *The American Statistician*. 1999;53(2):126–131. <https://doi.org/10.1080/00031305.1999.10474445>

18. Maier RM. Bacterial Growth. In: Maier RM, Pepper II, Gerba CP. *Environmental Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2000. Chapter 3. p. 43–60.

19. Barley MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 1992;23(3):257–270.

20. Morozova YuA, Skvortsov EV, Alimova FK, Kanarsky AV. The biosynthesis of xylanases and cellulases by *Trichoderma* fungi in the post-alcohol bard. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of the Technological University*. 2012;15(19):120–122. (In Russian)

21. Ha DT, Kanarsky AV, Kanarskaya ZA,

Shcherbakov AV, Shcherbakova EN. The efficiency of *Paenibacillus mucilaginosus* bacteria cultivation on nutrient medium based on sucrose. *Nauchnyi zhurnal NIU ITMO. Seriya: Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv = Scientific Journal NRU ITMO. Processes and Food Production Equipment*. 2019;3:62–72. (In Russian) <https://doi.org/10.17586/2310-1164-2019-12-3-62-72>

22. Ha DT, Kanarskaya ZA, Kanarsky AV, Shcherbakov AV, Shcherbakova EN. The effect of carbon source on the biomass and exopolysaccharide synthesis by *Paenibacillus mucilaginosus* bacteria. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019;9(3):509–518. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2019-9-3-509-518>

23. Yarovenko VL, Marinchenko VA, Smirnov VA, Ustinnikov BA, Tsygankov PS, Shvets VN, et al. *Technology of alcohol*. Moscow: Kolos-Press; 2002. 464 p. (In Russian)

24. Emtiazia G, Ethemadifara Z, Habibib MH. Production of extra-cellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. *African Journal of Biotechnology*. 2004;3(6):330–333. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2060>

25. Razack SA, Velayutham V, Thangavelu V. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish Journal of Biology*. 2013;3(37):280–288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>

26. Chaijamrus S, Uduyay N. Production and Characterisation of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. X p. 1–12, 2008.

27. Sharma N, Prasad GS, Choudhury AR. Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydrate Polymers*. 2013;93(1):95–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.059>

28. Elisashvili VI, Kachlishvili ET, Wasser SP. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(5):531–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>

29. Wang C-L, Huang T-H, Liang T-W, Fang C-Y, Wang S-L. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023. *New Biotechnology*. 2011;28(6):559–565. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.03.003>

#### **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**

**Ха Тхи Зунг,**  
аспирант кафедры пищевой биотехнологии,  
Казанский национальный исследовательский  
технологический университет,

#### **INFORMATION ABOUT THE AUTHORS**

**Dung T. Ha,**  
Postgraduate Student,  
Department of Food Biotechnology,  
Kazan National Research Technological Univer-

420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,  
Российская Федерация,  
e-mail: coldwind.91@mail.ru

**Канарский Альберт Владимирович,**  
д.т.н., профессор кафедры пищевой  
биотехнологии,  
Казанский национальный исследовательский  
технологический университет,  
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,  
Российская Федерация,  
✉ e-mail: alb46@mail.ru

**Канарская Зося Альбертовна,**  
к.т.н., доцент кафедры пищевой  
биотехнологии,  
Казанский национальный исследовательский  
технологический университет,  
420015, г. Казань, ул. Толстова, 8,  
e-mail: zosya\_kanarskaya@mail.ru

**Щербаков Андрей Владимирович,**  
к.б.н., научный сотрудник лаборатории  
технологии микробных препаратов,  
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
метеорологии,  
196608, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3,  
Российская Федерация,  
e-mail: microbe-club@inbox.ru

**Щербакова Елена Николаевна,**  
к.с.-х.н., младший научный сотрудник  
лаборатории технологии микробных  
препаратов,  
Всероссийский НИИ сельскохозяйственной  
метеорологии,  
196608, С.-Петербург, шоссе Подбельского, 3,  
Российская Федерация,  
e-mail: alonagonchar@mail.ru

#### **Заявленный вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад  
в подготовку публикации.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта ин-  
тересов.

*Все авторы прочитали и одобрили  
окончательный вариант рукописи.*

*Статья поступила в редакцию 13.10.2020;  
одобрена после рецензирования 18.11.2020;  
принята к публикации 30.11.2020.*

sity,  
8, Tolstov St., Kazan, 420015,  
Russian Federation,  
e-mail: coldwind.91@mail.ru

**Albert V. Kanarsky,**  
Dr. Sci. (Engineering), Professor,  
Department of Food Biotechnology,  
Kazan National Research Technological  
University,  
8, Tolstov St., Kazan, 420015,  
Russian Federation,  
✉ e-mail: alb46@mail.ru

**Zosia A. Kanarskaya,**  
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,  
Department of Food Biotechnology,  
Kazan National Research Technological  
University,  
8, Tolstov St., Kazan, 420015,  
Russian Federation,  
e-mail: zosya\_kanarskaya@mail.ru

**Andrei V. Shcherbakov,**  
Cand. Sci. (Biology), Researcher,  
laboratory of Microbial Technology,  
All-Russia Research Institute for Agricultural  
Microbiology,  
3, Podbelsky Highway, St. Petersburg, 196608,  
Russian Federation,  
e-mail: microbe-club@inbox.ru

**Elena N. Shcherbakova,**  
Cand. Sci. (Agriculture), Researcher,  
laboratory of Microbial Technology,  
All-Russia Research Institute for Agricultural  
Microbiology,  
3, Podbelsky Highway, St. Petersburg, 196608,  
Russian Federation,  
e-mail: alonagonchar@mail.ru

#### **Contribution of the authors**

The authors contributed equally to this article.

#### **Conflict of interests**

The authors declare no conflict of interests.

*All authors have read and approved the final  
manuscript.*

*The article was submitted 13.10.2020;  
approved after reviewing 18.11.2020;  
accepted for publication 30.11.2020.*