

# INNOVATIVE BIOSYSTEMS AND BIOENGINEERING

International scientific e-journal

---

Vol. 6 • No. 1

2022

---

Founded in November, 2017

## EDITOR-IN-CHIEF

Alexander GALKIN, Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Ukraine

## DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Oleksandr SOLDATKIN, Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Ukraine

## EDITORIAL COUNCIL

Adam VOELKEL,	Poznań University of Technology, Poland
Belur PRASANNA,	National Institute of Technology Karnataka, India
Gilbert AHAMER,	Austrian Academy of Sciences, Environment Agency Austria, Austria
Grzegorz ŁAGYD,	Lublin University of Technology, Poland
Henryk SOBCZUK,	Lublin University of Technology, Poland
Ievgen NASTENKO,	Amosov National Institute of Cardiovascular Surgery, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine
Ivars KALVINSH,	Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia
Jakub D. RYBKA,	Adam Mickiewicz University, Poland
Larysa BONDARENKO,	SI "Institute of Pharmacology & Toxicology NAMS of Ukraine", Ukraine
Marceli KORALEWSKI,	Adam Mickiewicz University, Poland
Natalia POYEDINOK,	Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Ukraine
Nataliia GOLUB,	Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Ukraine
Olena KARPENKO,	Department of Physics and Chemistry of Fossil Fuels InPOCC, NAS of Ukraine, Ukraine
Svetlana RYBALKO,	Gromashevsky L.V. Institute of Epidemiology and Infection Diseases, Ukraine
Tetiana TODOSIICHUK,	Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Ukraine
Vitalii ZABLOTSKII,	Institute of Physics, Academy of Sciences of Czech Republic, Czechia
Vladimir SHIROBOKOV,	Bogomolets National Medical University, Ukraine
Walery ZUKOW,	Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

Editorial office:

building 4, Av. Peremogy, 37, Kyiv, 03056,

National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

E-mail: [ibb@ill.kpi.ua](mailto:ibb@ill.kpi.ua)

<http://ibb.kpi.ua>

Founder and Publisher – National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

---

## Table of Contents

<b>Nikolov N.A., Makeev S.S., Korostynska O., Novikova T.G., Kriukova Ye.S.</b> Gaussian Filter for Brain SPECT Imaging .....	<b>4</b>
<b>Danylenko S.G., Marynchenko L.V., Bortnyk V.V., Potemska O.I., Nizhelska O.I.</b> Use of Highly Dispersed Silica in Biotechnology of Complex Probiotic Product Based on Bifidobacteria .....	<b>16</b>
<b>Yurchenko A.V., Golub N.B., Jinping L.</b> Development of a New Method for Obtaining the Bioplastics Based on Microbial Biopolymers and Lignin .....	<b>25</b>
<b>Korotkova I.V., Chaika T.O., Romashko T.P., Rybalchenko A.M.</b> Photosynthetic Pigments Content in Emmer Wheat Plants as Criteria of Productivity in Traditional and Organic Farming Technology .....	<b>31</b>
<b>Potrohov A.O., Sosnovskaya D.I., Ovcharenko O.O.</b> Segmentation of Tuberculosis Lungs on Computer Tomography Images.....	<b>40</b>

## GAUSSIAN FILTER FOR BRAIN SPECT IMAGING

N.A. Nikolov<sup>1,4\*</sup>, S.S. Makeev<sup>2</sup>, O. Korostynska<sup>3</sup>, T.G. Novikova<sup>2</sup>, Ye.S. Kriukova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Romodanov Neurosurgery Institute, NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Oslo Metropolitan University, Oslo, Norway

<sup>4</sup>Kundiiev Institute of Occupational Health, NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\*Corresponding author: nikolka\_@ukr.net

Received 7 January 2022; Accepted 2 February 2022

**Background.** The presence of a noise component on 3D images of single-photon emission computed tomography (SPECT) of a brain significantly distorts the probability distribution function (PD) of the radioactive count rate in the images. The presence of noise and further filtering of the data, based on a subjective assessment of image quality, have a significant impact on the calculation of volumetric cerebral blood flow and the values of the uptake asymmetry of the radiopharmaceutical in a brain.

**Objective.** We are aimed to develop a method for optimal SPECT filtering of brain images with lipophilic radiopharmaceuticals, based on a Gaussian filter (GF), for subsequent image segmentation by the threshold method.

**Methods.** SPECT images of the water phantom and the brain of patients with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO were used. We have developed a technique for artificial addition of speckle noise to conditionally flawless data in order to determine the optimal parameters for smoothing SPECT, based on a GF. The quantitative criterion for optimal smoothing was the standard deviation between the PD of radioactive count rate of the smoothed image and conditionally ideal one.

**Results.** It was shown that the maximum radioactive count rate of the SPECT image has an extremum by changing the standard deviation of the GF in the range of 0.3–0.4 pixels. The greater the noise component in the SPECT image, the more quasi-linearly the corresponding rate changes. This dependence allows determining the optimal smoothing parameters. The application of the developed smoothing technique allows restoring the probability distribution function of the radioactive count rate (distribution histogram) with an accuracy up to 5–10%. This provides the possibility to standardize SPECT images of brain.

**Conclusions.** The research results of work solve a specific applied problem: restoration of the histogram of a radiopharmaceuticals distribution in a brain for correct quantitative assessment of regional cerebral blood flow. In contrast to the well-known publications on the filtration of SPECT data, the work takes into account that the initial tomographic data are 3D, rather than 2D slices, and contain not only uniform random Gaussian noise, but also a pronounced speckle component.

**Keywords:** emission computed tomography; SPECT; cerebral blood flow; radioactive count; Gaussian filter; optimal filtering; speckle-noise; radiopharmaceutical; <sup>99m</sup>Tc-HMPAO.

### Introduction

The main objective of scintigraphic studies of brain with lipophilic radiopharmaceuticals is the studying brain efficient perfusion. In this regard, a method for quantitative assessment of absolute volume of cerebral blood flow (CBF) was developed [1, 2]. The term "absolute" implies the calculation of CBF without reference to any segment of the brain with known parameters of effective perfusion, for example, using the well-known Lassen's method [3, 4]. Methodology and software for the calculation of the CBF, developed by our working group, make it possible to measure absolute values of volumetric blood flow directly. The accumulated clinical experience of calculation usage of the abso-

lute CBF method [1, 2] and the development of appropriate software were resulted in a set of data analysis features [5].

The method is based on the fact that a brain is represented as a flow system. In accordance with the proposed model, a fluid with a volume velocity  $v$  and a material with a concentration of  $z$  dissolve flow to the container of volume  $V$  with ideal instant mixing. A part of the material is specifically captured by perceiving surface elements, another part is removed from the tank. However, the effective volume of radiopharmaceutical dilution in blood  $V$  is not equal to the volume of the brain ( $V_0$ ), but represents a certain effective value ( $V < V_0$ ). The corresponding empirical dependence was obtained for determining the effective volume of radiopharmaceuticals dilu-

tion in brain based on regression and statistical analysis. Based on this dependence, the threshold for segmentation of single-photon emission computed tomography (SPECT) data was determined. The amount of voxels exceeds this threshold and is the desired volume. Based on this method, clinical data were obtained and their adequacy was indicated. However, sometimes quantitative values of blood flow inadequate to physiologically accepted values were observed. The detailed analysis of such cases showed that the main error of the calculations was associated with the degree of smoothing SPECT images of the brain. The brain segmentation threshold for determining the volume  $V$  is calculated from the maximum accumulation of the radiopharmaceutical in a brain. A similar approach was used, in particular, in analysis of brain by SPECT in the diagnosis of Alzheimer's disease [6]. It should also be noted that the quality of radionuclide images is limited not only by hardware capabilities, but also by the number of radiopharmaceuticals administered to the patient and the functional state of other organs and systems [7–9]. There are a significant shift of the histogram of velocity distribution of radioactive count rate (CR) and a change in the maximum CR in smoothing SPECT. Due to the high level of noise in SPECT images and low brain perfusion, extremely low values of CBF were observed; at a sufficiently high accumulation of the radiopharmaceutical in a brain, even minor smoothing led to inappropriately large values of CBF. In this regard, the task was to determine the optimal degree of smoothing of SPECT data. By optimal smoothing, we mean the minimal 3D smoothing (filtering) of an image, which makes it possible to bring the histogram (probability distribution function) of the radiopharmaceutical distribution in a brain to the conditionally necessary one in order to obtain adequate values of  $V$ . At the same time, this filtering should not impair perception of images at a qualitative visual level.

In this case, the criteria for assessing the quality of filtering are the subjective visual assessment of the image quality and the smallest Root Mean Square Error (RMSE) of CR of the results for some conditionally ideal image [10]. In the last case, the conditionally ideal SPECT image is obtained when conducting a study with a long exposure time of one projection frame.

Based on the analysis of scientific literature and our own experience in researching methods for determining the optimal filtering of SPECT images, we can point out the following methodological errors and incorrect experimental design:

- images are often represented by regions with a uniform distribution of brightness, while scintigraphic images, especially of patients, are always gradient in computer modeling;
- incorrect artificial data noise;
- one SPECT image requires approximately 20–40 min, when carrying out phantom scintigraphic studies, which does not allow obtaining a sufficient amount of data of different quality under equivalent conditions, since radioactive decay occurs, CR changes, the signal-to-noise ratio changes;
- in most cases, a small number of patient images are analyzed;
- it is not taken into account that the textural properties of SPECT can differ significantly from the norm in case of pathologies [11].

As a result, the issue related to the optimal filtering of medical images in a specific SPECT brain has not been completely resolved [12]. In addition, the optimal filtering parameters depend on the purpose and objectives of image analysis. For example, visualization of images, their segmentation, quantitative and texture analysis may require different approaches.

The aim of this work is to develop a method for optimal SPECT filtering of brain images with lipophilic radiopharmaceuticals based on a Gaussian filter for subsequent image segmentation by the threshold method.

## Methods

The study has used SPECT images of the water phantom and 20 patients with different levels of brain perfusion, the change in the texture properties of SPECT images depended on the filtering parameters.

The water phantom was a cylinder 20 cm in diameter and 40 cm high. The exposure time of one frame during studies with  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate was 20 s, 15 s, 10 s, 5 s; data collection matrix – 64×64 and 128×128, the activity – 50 MBq. To ensure uniform distribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate in the phantom, the initial amount of water in it was about 2/3 of the total volume. This allows shaking and ensures good mixing. After that, the phantom was completely filled with water and settled for about 20 min. The uniformity of radioactivity distribution in the water phantom was monitored on planar (2D) scintigraphic images. The correction for gamma radiation absorption has not been taken into account during the reconstruction of SPECT for obtaining an uneven texture of the phantom SPECT image, which is more similar to the distribution of the radiopharmaceutical in a brain.

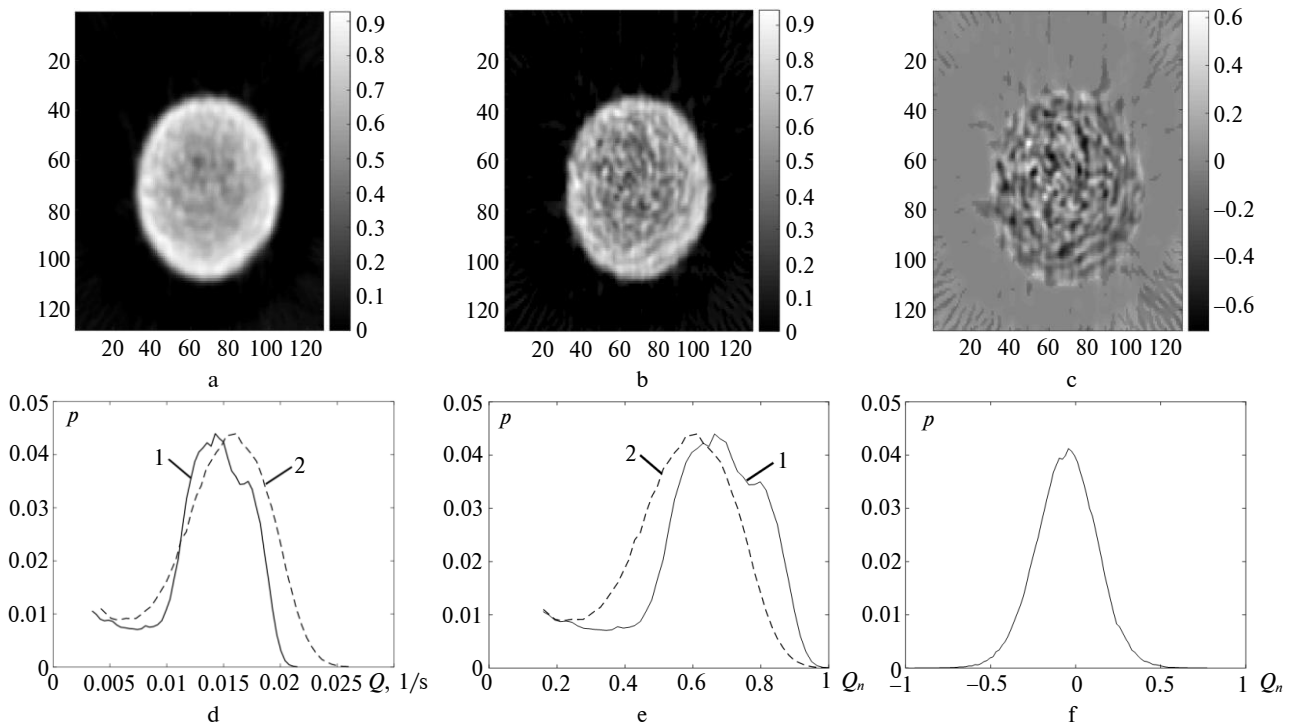
Patients were examined using  $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethylpropyleneamine oxime ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO). SPECT was carried out 15–20 min after intravenous administration of the radiopharmaceutical. The tomographic study included the collection of 64 projections for the matrix of  $64 \times 64$  or 128 projections for the matrix of  $128 \times 128$ , the activity of the radiopharmaceutical when administered intravenously was 740 MBq.

Scintigraphic data were obtained on a gamma camera "E. Cam" (Siemens) equipped with a LEHR collimator.

Image processing and analysis were carried out in the Matlab 2018 environment in the application "ScintyBrain" with the user interface developed by the authors [5].

The obtained SPECT images were smoothed by a Gaussian filter with the filter order  $[n_x, n_y, n_z]$  and standard deviation  $[\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z]$ ;  $n_x = n_y = n_z = n_f$ ;  $\sigma_x = \sigma_y = \sigma_z = \sigma_f$ .  $n_f$  took the values 3, 5, 7 and 9;  $\sigma_f$  – from 0.1 to 7 in increments of 0.1. The optimal smoothing parameters  $n_{f0}$  and  $\sigma_{f0}$  were chosen by minimum RMSE between the probability distribution functions (PD) of CR ( $p = f(Q)$ ) of smoothed SPECT images and conditionally ideal one. As theoretically ideal distribution functions, we considered the distribution of the SPECT image matrix of  $128 \times 128$  with an exposure time of one frame of 20 s.

SPECT images, selected by expert-qualitative visual level, belonged to conditionally ideal PD of CR in patients. All patients had the CBF of the brain hemisphere either within normal limits or increased, which corresponded to a percentage of radiopharmaceutical penetration into the brain of more than 3% of the administered activity. Also, to minimize the influence of digital noise, the ideal SPECT images were smoothed by a Gaussian filter with  $n_f = 3$ ,  $\sigma_f = 0.3$ . These are the minimum values at which the minimal visual effect of smoothing is observed. Based on the results of SPECT smoothing, we have compared images obtained at different resolutions and exposure times of one frame during the preliminary study. However, due to the duration of SPECT, it is impossible to record a sufficiently large amount of data under equivalent conditions for statistical and regression analysis. So, an algorithm for noise reduction of conditional ideal images was developed. The use of this algorithm made it possible to vary the SPECT image quality over a wide range and to estimate the optimal filter parameters. The noise distribution was estimated by the difference between the conditionally ideal images and SPECT obtained with shorter frame exposure time for phantom images. Graphical results of this analysis are presented in Fig. 1, where  $Q_n$  – CR normalized by the maximum velocity in the whole 3D SPECT image ( $Q_{\max}$ ).



**Figure 1:** Evaluation of the spatial distribution of SPECT noise: (a), (b) transverse slices normalized to the maximum radioactivity of the phantom image obtained at the exposure times of the projection frame: (a) 20 s, (b) 10 s; (c) differential SPECT image obtained under conditions (a) and (b); (d), (e) probability distribution function of 3D SPECT images for an exposure time of 20 s – 1, 10 s – 2; (f) is a noise probability distribution function of the 3D difference image (c)

The analysis of the data in Fig. 1 shows the following. With the decrease in the exposure time of projection images,  $Q_{\max}$  can differ significantly (by more than 5–10%) from the conditionally true value in the reconstructed 3D image (Fig. 1d). This causes the histogram or  $p = f(Q)$  to shift to the right. As a result, the presence of the noise component shifts  $p = f(Q_n)$  towards lower values of the radioactive CR after SPECT normalization to  $Q_{\max}$ , i.e. to the left (Fig. 1e).  $p = f(Q_n)$  for the SPECT differential image; one of the sections shown in Fig. 1c shows the normal Gaussian noise distribution (Fig. 1f). This is one of the main features that led to the study of the possibilities of using Gaussian smoothing in this work.

However, Fig. 1c indicates that the noise component in SPECT images is represented by speckle noise in the useful region (phantom region); thus, the farther the phantom is from the center (the axis of the gamma-camera detector rotation), the more the speckle patterns are extended radially. In addition, it is noteworthy that the spatial distribution of artifacts is qualitatively different in the useful region and in the background one. Speckles associated with the effects of a "star" (or "streak") artifact dominate in the background region [13]. In this regard, the optimal filtering (smoothing) parameters should be different for the useful SPECT region and the background one. In this work, we study the optimal filtering for a useful region, i.e. phantom or brain regions. The threshold method was used to separate the useful region from the background: the one where  $Q(x, y, z) > 0.15 Q_{\max}$  was considered a useful region. This also allows minimizing the influence of the background on  $p = f(Q)$  and the subsequent estimation of the standard deviation of the smoothed images from conditionally ideal ones, since the volume of the background region is quite large and can exceed the useful region.

The latter feature has not been emphasized in the literature. It should also be noted that the threshold of  $0.15 Q_{\max}$  adequately separates the phantom image from the background, since the boundary is clear, while for brain images this value is ambiguous due to the uneven distribution of the radiopharmaceuticals. This complicates an unambiguous assessment of the smoothing effect of brain SPECT. However, this feature did not affect the general results of this work.

Thus, the SPECT image noise reduction algorithm mentioned above is a speckle noise generation technique whose probability distribution function obeys the Gaussian distribution:

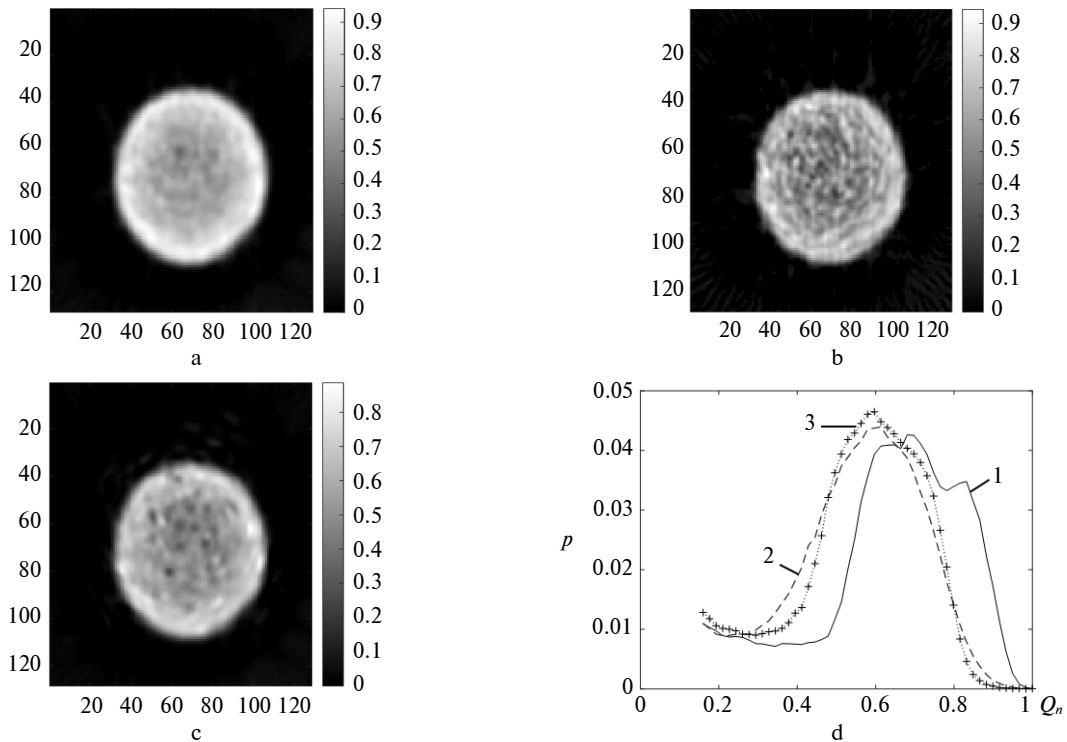
$$G(x, y, z) = M \cdot \exp \left\{ - \left( \frac{(x - x_0)^2}{2\sigma_{x\text{nois}}^2} + \frac{(y - y_0)^2}{2\sigma_{y\text{nois}}^2} + \frac{(z - z_0)^2}{2\sigma_{z\text{nois}}^2} \right) \right\}, \quad (1)$$

where  $G(x, y, z)$  is the Gaussian distribution of an individual speckle-noise pattern,  $x_0, y_0, z_0$  are coordinates of the pattern,  $\sigma_{x\text{nois}}, \sigma_{y\text{nois}}, \sigma_{z\text{nois}}$  are standard deviations,  $M$  is an intensity of the pattern.

The speckle-noise generation algorithm for SPECT image is reduced to the following steps:

1. Downloading the original SPECT image ( $I_0$ ) and the formation of the 3D zero matrix ( $I_g$ ), size  $I_0$ .
2. Setting the noise parameters: maximum intensity ( $M_0$ );  $\sigma_{x\text{nois}}, \sigma_{y\text{nois}}, \sigma_{z\text{nois}}$ ; the minimum geometric size of the Gaussian speckle-noise pattern  $d_x, d_y, d_z$ ; number of iterations, i.e. the number of patterns ( $n$ ); the angle  $\alpha$  in the  $xy$  plane with respect to the centre of detector rotation, at which the pattern will be blurred.
3. Specifying the region of noise ( $\Omega$ ). In this paper, the useful volume was separated from the background region based on the threshold segmentation  $I_0$ .  $\Omega$  is the region where  $I_0$  assumed values of more than a given level ( $Th$ ) from the maximum radioactive CR  $Q_{\max}$ .
4. Generation according to the uniform distribution law of random coordinates  $(x_0, y_0, z_0) \in \Omega$  and noise intensity ( $M$ ) according to the normal distribution law that limits the values of  $M_0$  ( $M \in [-M_0, +M_0]$ ).
5. The formation of the Gaussian speckle noise pattern in the  $I_g$  image according to the equation (1), where  $x \in [x_0 - d_x/2, x_0 + d_x/2]$ ,  $y \in [y_0 - d_y/2, y_0 + d_y/2]$ ,  $z \in [z_0 - d_z/2, z_0 + d_z/2]$ .
6. Transferring/stretching the pattern formed in the previous step by the angle  $\alpha$  parallel to the  $xy$  plane.
7. Repeating  $n$  times for steps 4–6.
8. SPECT image formation of  $I_{Gn}$  with Gaussian speckle noise by summing  $I_g$  and  $I_0$  and zeroing the obtained negative values.

The following assumptions were made for SPECT with the matrix of  $128 \times 128$  by implementing the above algorithm:  $\sigma_x = \sigma_y = \sigma = 1.5$ ;  $\sigma_z = \sigma/2$ ;  $d = d_x = d_y = d_z$  (for the data acquisition matrix of  $64 \times 64$ :  $d = 3$ ,  $128 \times 128$ :  $d = 5$ ,  $256 \times 256$ :  $d = 7$ );  $\alpha = 26^\circ$ ,  $Th = 0,15$ . The number of iterations is  $n = 12000$ . Thus, the noise level of the  $I_{Gn}$  image and the distortion of the histogram of the CR distribution were determined by the parameter  $M_0$  for the indicated parameter values.

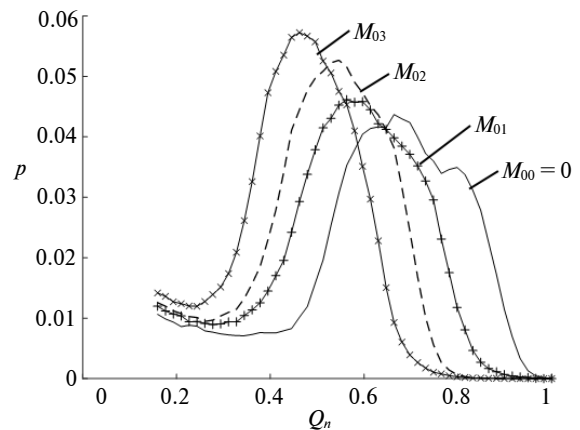


**Figure 2:** Cross-section of a water phantom. An example of the SPECT distortion by speckle noise: (a), (b) initial phantom cross-sections obtained at exposure times of one frame of 20 s (a) and 10 s (b); (c) the result of adding speckle noise to image (a); (d) the probability distribution function of the normalized radioactive count rate: 1 – SPECT with a projection frame exposure time of 20 s, 2 – 10 s, 3 – after adding speckle noise

## Results

Fig. 2 shows the results of artificial noise in SPECT images of a water phantom based on the developed algorithm. Histogram analysis of the corresponding 3D images indicates a fairly adequate coincidence  $p = f(Q_n)$  of the artificially noisy image and SPECT (curves 3 and 2 respectively in Fig. 2g), which was obtained with a reduced exposure time of the projection frame during data collection.

Fig. 3 shows the result of changing the function  $p = f(Q_n)$  depending on the maximum speckle-noise intensity ( $M_0$ ) (see (1) and Section 4 in the noise generation algorithm in the previous subsection). As  $M_0$  increases, the maximum probability of the normalized radioactive CR  $Q_n$  increases its value and shifts toward lower  $Q_n$  values; with increasing  $M_0$ , the general form  $p = f(Q_n)$  qualitatively retains its shape, however, some smoothing of the characteristic irregularities of the conditionally ideal curve is observed (curve  $M_{00}$  in Fig. 3). The heterogeneity data has been restored after the optimal filtering procedure.



**Figure 3:** Change in the function  $p = f(Q_n)$  depending on the maximum intensity of speckle noise ( $M_0$ ):  $M_{00} = 0$  – absence of artificial noise;  $M_{01} < M_{02} < M_{03}$

The change in RMSE between the  $p = f(Q_n)$  of the conditionally ideal SPECT of the water phantom and the artificially noisy image, as well as the change in the maximum ( $Q_{n\max}$ ) and average brightness ( $Q_{n\text{mean}}$ ) after subsequent smoothing by a 3D Gaussian filter with different values of  $\sigma_f$  and  $n_f$  are

presented in Fig. 4. Graphical dependencies show a monotonic decrease in  $Q_{n \max}$  and  $Q_{n \text{mean}}$  with increasing  $\sigma_f$  and  $n_f$  (Fig. 4a,b). Moreover the average value changed by no more than 11% (the range of change  $Q_{n \text{mean}} \approx 0.42\text{--}0.47$ ) after sufficiently strong SPECT smoothing, while the maximum value of  $Q_{n \max}$  (Fig. 4b) shows a rather high sensitivity to the parameters of the smoothing function (the range of change  $Q_{n \max} \approx 0.7\text{--}1$ ,  $Q_{n \max} = 1$  matches the image without smoothing).

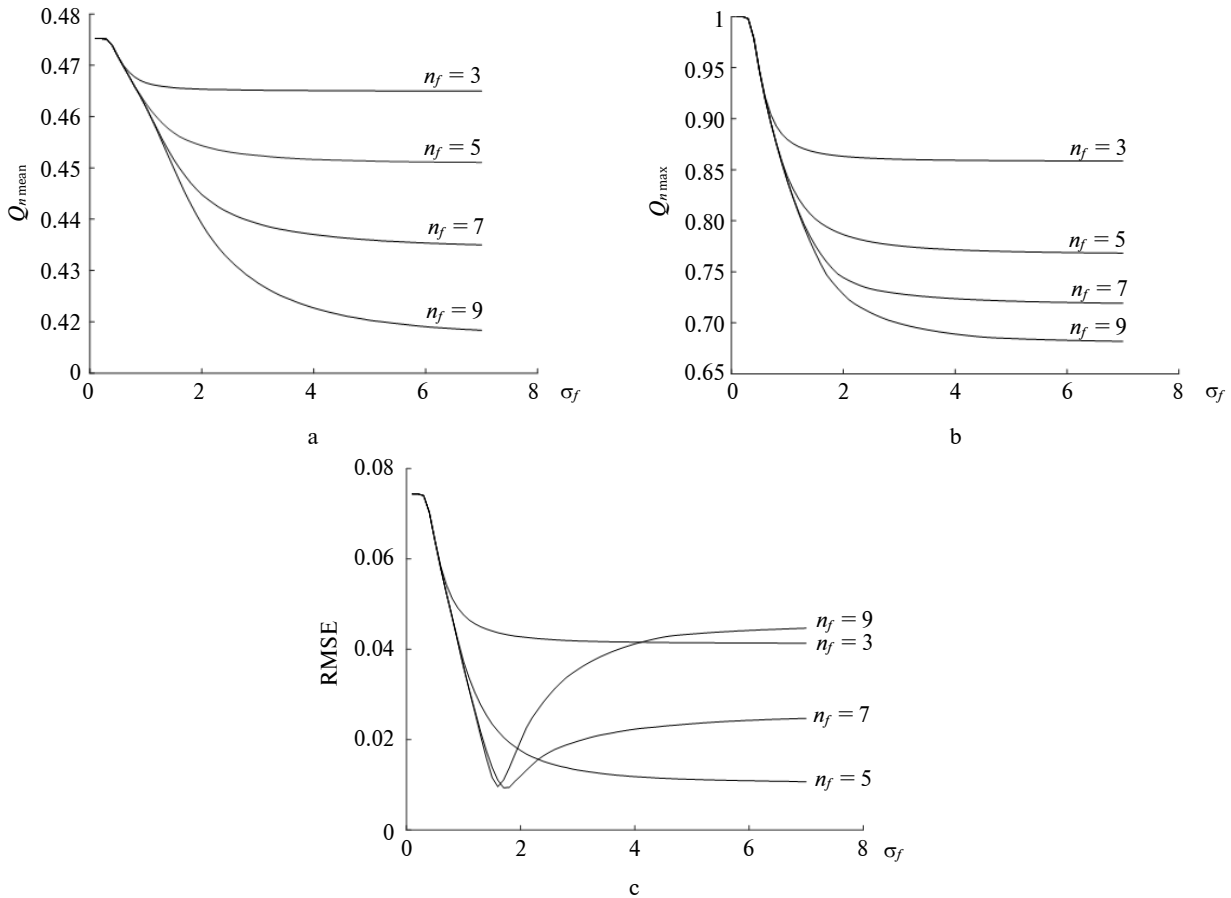
When speckle noise is added to the conditionally ideal SPECT phantom image, the subsequent smoothing of the 3D image of the RMSE of the functions  $p = f(Q_n)$  of the initial and smoothed images with increasing  $\sigma_f$  is characterized by the presence of a minimum point (Fig. 4c, curves  $n_f = 7$  and 9). The dependencies presented in Fig. 4 correspond to sufficiently strong SPECT noise, where  $p = f(Q_n)$  is shown in Fig. 3 for  $M_{03}$ . In this case, smoothing SPECT by a Gaussian filter with the order  $n_f = 3$  and 5 does not lead to the formation of extreme curves.

The rate of change  $Q_{n \max}$  was estimated based on the approximation depending on  $\sigma_f$ :

$$\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f = \frac{Q_{n \max}(\sigma_f + \Delta \sigma_f) - Q_{n \max}(\sigma_f)}{\Delta \sigma_f}.$$

The examples of graphical dependencies of changes in  $\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f$  for various values  $\sigma_f$  and  $n_f$  are presented in Fig. 5. The maximum of  $|\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f|$  for phantom was observed for  $\sigma_f = 0.3\text{--}0.4$ , regardless of the noise level and  $n_f$  (Fig. 5a). The presence of the noise component on SPECT affects the absolute value of  $\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f$  (Fig. 5b): an increase in the noise parameter  $M_0$  leads to sharper drops  $\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f$  in the vicinity of  $\sigma_f = 0.3\text{--}0.4$ .

The regression analysis of the optimal values of  $\sigma_{f0}$  and  $n_{f0}$  at various levels of SPECT speckle-noise intensity showed that the section of the curve  $\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f$  at  $\sigma_f = 0.05\text{--}0.4$  is quasi-linear, the slope of which characterizes the optimal value of  $\sigma_{f0}$  with sufficient accuracy (Fig. 6a). In Fig. 6, the  $D_Q$  is value of  $\Delta Q_{n \max} / \Delta \sigma_f$  at  $\sigma_f = 0.3$ . The optimal para-



**Figure 4:** Change of the textural properties of the water phantom SPECT at various Gaussian smoothing parameters: (a) average count rate; (b) maximum count rate; (c) Root Mean Square Error between  $p = f(Q_n)$  for the conditionally ideal image and smoothing image with noise



parameters  $\sigma_{f0}$  and  $n_{f0}$  can generally show some independence from each other. However, it is possible to require and impose the condition of the direct dependence of the increase in  $n_{f0}$  on  $\sigma_{f0}$  (Fig. 6b).

Water phantom studies have also been presented on SPECT patients. In these cases, all the patterns presented in this work were equivalent to phantom studies, which is confirmed by the regression data in Fig. 6. The resulting regression equations were as follows:

for SPECT patients

$$\sigma_{f0} = -(6.57 \pm 1.3)D_{Q0.4} + (0.20 \pm 0.11) \quad (R^2 = 0.75 \pm 0.31),$$

$$n_{f0} = (1.46 \pm 0.7)\sigma_{f0} + (2.57 \pm 0.27) \quad (R^2 = 0.62 \pm 0.11);$$

for phantom SPECT

$$\sigma_{f0} = -(6.5 \pm 0.3)D_{Q0.4} + (0.16 \pm 0.10) \quad (R^2 = 0.81 \pm 0.05),$$

$$n_{f0} = (1.92 \pm 0.05)\sigma_{f0} + (2.42 \pm 0.14) \quad (R^2 = 0.79 \pm 0.04),$$

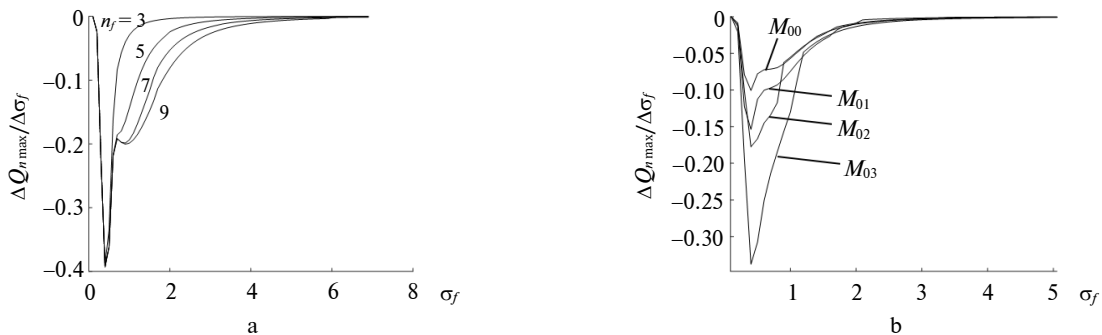
where  $R$  is the correlation coefficient between the experimental and model data.

We recommend to apply smoothing with minimally significant parameters for 3D images  $\sigma_f = 0.3$  and  $n_f = 3$ , because real SPECT images always have a noise component, including digital noise, even with good image quality (see Fig. 5b at  $M_{00}$ ). The recommended values for optimal SPECT filtering can be expressed as:

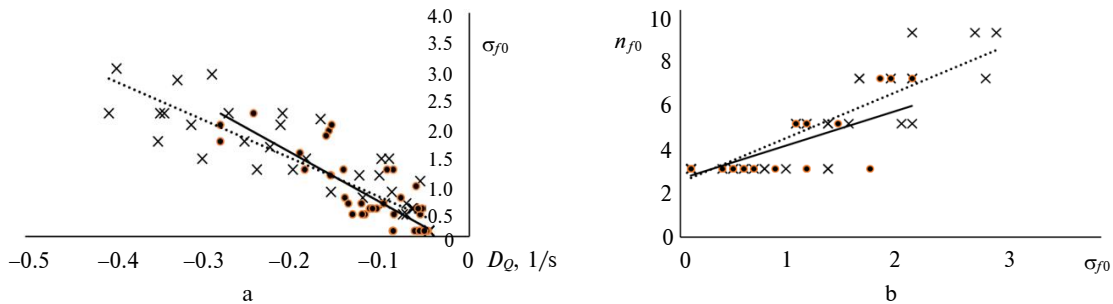
$$\sigma_{f0} = -6,57D_{Q0.4} + 0.2 \text{ and } n_{f0} = 1.1\sigma_{f0} + 3, \quad (3)$$

where  $n_{f0}$  is rounded up to the nearest of 3, 5, 7, or 9.

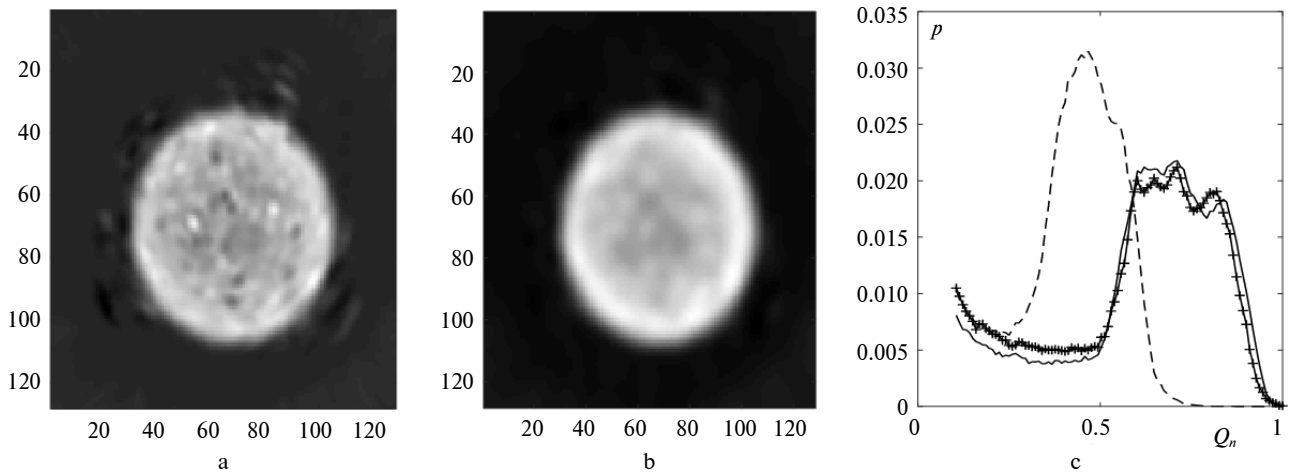
A cumulative use of (2) to calculate the most effective smoothing parameters of the 3D SPECT Gaussian filter both for phantom images and patients gives a fairly good agreement of the functions  $p = f(Q_n)$ , where the average deviation of the CR is less than 5–7%, the maximum deviation is observed in the low-intensity region ( $Q_n < 0.5$ ), where the error in the restoring the function  $p = f(Q_n)$  reaches 10–12%. The used examples (2) are presented in Figs. 7 and 8. Note that when segmenting the brain and determining the effective volume of dilution of the radiopharmaceutical in accordance with the methodology for calculating CBF [1, 2, 5], the segmentation threshold  $Th$  is in the range 0.55–0.90. This means that the results of finding the optimal parameters  $\sigma_{f0}$  and  $n_{f0}$  for a Gaussian filter are quite acceptable.



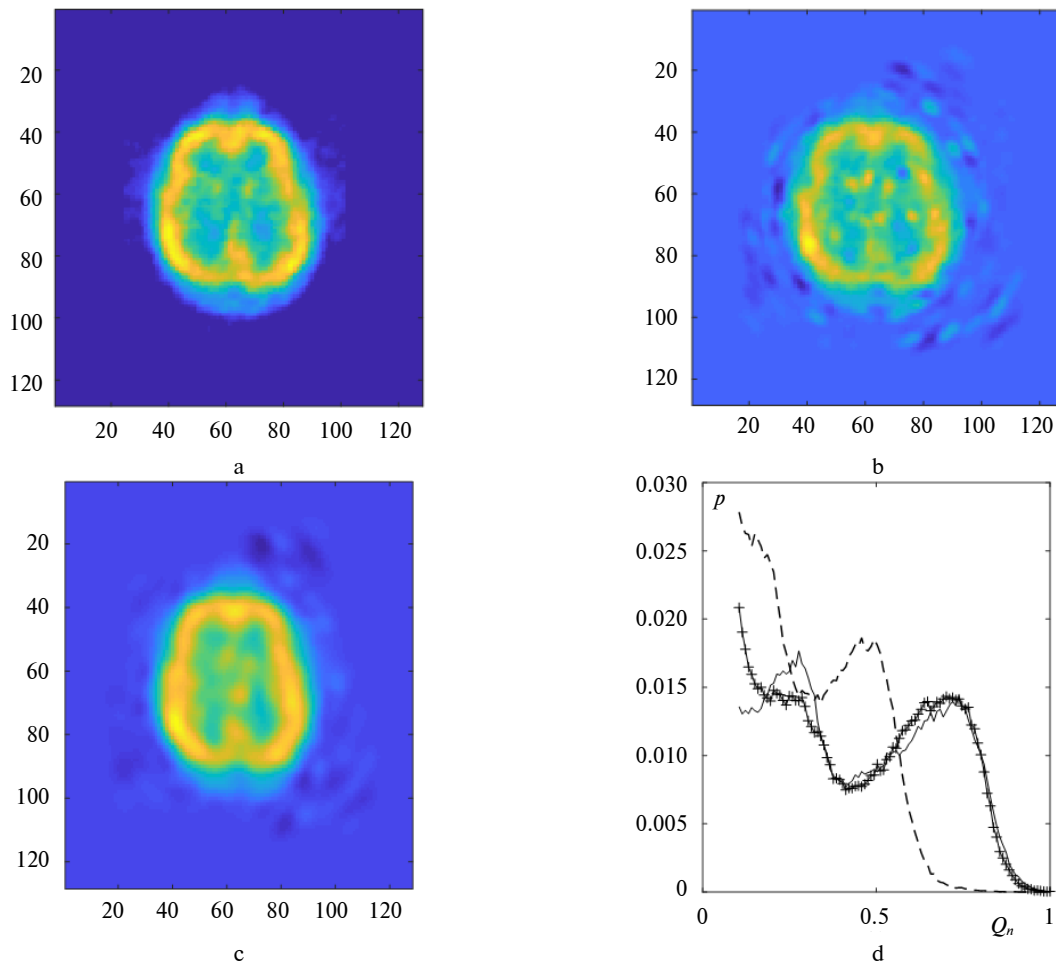
**Figure 5:** The rate of change count range with respect to  $\sigma_f$ : (a) for SPECT of the water phantom at  $M_{03}$ ; (b) for various of  $M_0$ . The effect of  $M_{0i}$  on  $p = f(Q_n)$  (see Fig. 3). The order of the Gaussian filter  $n_f$  does not affect the extremum in the vicinity of  $\sigma_f = 0.3-0.4$



**Figure 6:** Regression dependencies of the optimal parameters  $\sigma_{f0}$  and  $n_{f0}$  obtained at different speckle noise intensities on SPECT: (a) the dependence of  $\sigma_{f0}$  on  $D_Q$ ; (b) the dependence of  $n_{f0}$  on  $\sigma_{f0}$ ;  $\times$  – for SPECT water phantom;  $-$  – for SPECT of the patient; the dashed line is a linear approximation of the SPECT data of the water phantom, the solid line is for the SPECT of the patient



**Figure 7:** The results of smoothing SPECT of the water phantom in accordance with (2): (a), (b) cross-sections of the phantom after adding speckle noise and smoothing, respectively; (c) the probability distribution function of the count rate, where the solid line is the initial, conditionally ideal probability distribution; dotted line – after adding speckle noise; + – after the smoothing procedure



**Figure 8:** An example of the results of smoothing SPECT of a patient's brain in accordance with (2): (a), (b), (c) cross-sections before, after adding speckle noise, and smoothing, respectively; (d) the probability distribution functions of the count rate, where the solid line is the initial, conditionally ideal probability distribution; dotted line – after adding speckle noise; + – after the smoothing procedure

## Discussion

A lot of articles have been published on the optimal filtering of SPECT images [12, 14–24]. The vast majority of publications focus on the use of the Butterworth filter [12, 14–18]. At the same time, it should be noted that it is difficult to single out recommendations for choosing a cutoff frequency. So, in [14] the optimal cutoff frequency is in the range 0.08–0.13, in [16, 25] – 0.2–0.22, in [18] – more than 0.5 depending on the RC speed. The parameters of optimal image filtering based on the Gaussian filter [22, 23, 26] are also contradictory and do not allow our working group to make a decision.

A specific direction in the development of technology for improving the quality of radionuclide brain images is the analysis and processing of multimodal data [27–29]. However, it should be noted that it is not always possible to obtain multimodal images; an increase in image resolution does not mean a more correct restoration of the spatial distribution of the radiopharmaceuticals in absolute units; the corresponding software has not been introduced into wide clinical practice, into workstations of gamma cameras.

The research results presented in this work are solving a specific applied problem: restoration of the histogram of the distribution of radiopharmaceuticals in a brain for a correct quantitative assessment of regional CBF. It is taken into account that the initial 3D tomographic data contain not only uniform random Gaussian noise, but also a pronounced speckle component. The technique has been tested in solving clinical problems, in particular in patients with moderate brain injury due to combat contusion [30].

The presented research results retained their regularities for SPECT of the water phantom with the data acquisition matrix of 256×256. The following limitations can be distinguished for images with a matrix of 64×64 in the analysis of patients' SPECT:  $0.2 \leq \sigma_{f0} \leq 1.5$  and  $n_f = 3$ .

It should also be noted that the technique presented in this work does not give significant positive results with pronounced sparseness of scintigraphic projection images, which are formed with a sharply reduced total CR or with a short exposure time of the frame during the SPECT study. The solution of the applied problem is not trivial and requires further research. This problem is considered, for example, in [31].

A novel technique for smoothing 3D SPECT images based on a Gaussian filter was developed. It was shown that the change in the maximum rate of the SPECT image RC has an extremum by changing

the standard deviation of the Gaussian filter in vicinity of 0.3–0.4 pixels. The greater the noise component in the SPECT image, the more quasi-linearly the corresponding speed changes. This dependence allows us to determine the optimal smoothing parameters.

The application of the developed smoothing technique allows restoring the probability distribution function of the radioactive CR (distribution histogram) with an accuracy of 5–10%. This allows standardizing SPECT images, in particular, of a brain, and carrying out image segmentation more correctly.

## Conclusions

The research results of the work solve a specific applied problem: restoration of the histogram of the radiopharmaceuticals distribution in a brain for correct quantitative assessment of regional cerebral blood flow. In contrast to the well-known publications on the filtration of SPECT data, the work takes into account that the initial tomographic data are 3D, rather than 2D slices, and contain not only uniform random Gaussian noise, but also a pronounced speckle component. This allows standardization of brain SPECT images in terms of the spatial distribution of the radiopharmaceuticals in a brain.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the SI "Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" for the opportunity to perform the work.

**Interests Disclosure:** Nikolay Nikolov, Sergiy Makeyev, Tetyana Novikova, Yelizaveta Kriukova, Olga Korostynska declare that they have no conflict of interest. The work was performed as part of research in SI "Romodanov Neurosurgery Institute of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" (Kyiv, Ukraine); State registration number: 0116U001031 "To investigate the polymodal evoked potentials of the brain, including cognitive, in patients with chronic ischemia in the vertebral-basilar basin, depending on disorders of cerebral blood suppl"; engineering studies were performed on a without payment (by initiative of the authors).

**Informed consent:** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Ethical approval:** All procedures performed in studies involving human participants were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki 1964 and its later amendments, the European Convention on Human Rights, which have been ratified

by Ukraine and are an integral part of national legislation.

This article does not contain any animal studies performed by any of the authors.

## References

- [1] Nikolov NA, Makeev SS, Yaroshenko OYu, Novikova TG, Globa MV. Quantitative evaluation of cerebral blood flow by scintigraphic studies with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO. *Meditsinskaya Fizika*. 2016;72:72-9.
- [2] Nikolov N, Makeyev S, Yaroshenko O, Novikova T, Globa M. Quantitative evaluation of the absolute value of the cerebral blood flow according to the scintigraphic studies with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO. *Res Bull Nat Tech Univ Ukr Kyiv Polytech Inst*. 2017;1:61-8. DOI: 10.20535/1810-0546.2017.1.91646
- [3] Lassen NA, Andersen AR, Friberg L, Paulson OB. The retention of [<sup>99m</sup>Tc]-d,l-HM-PAO in the human brain after intracarotid bolus injection: A kinetic analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988 Dec;8(1\_suppl):S13-22. DOI: 10.1038/jcbfm.1988.28
- [4] Andersen AR, Friberg HH, Schmidt JF, Hasselbalch SG. Quantitative measurements of cerebral blood flow using SPECT and [<sup>99m</sup>Tc]-d,l-HM-PAO compared to Xenon-133. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1988 Dec;8(1\_suppl):S69-81. DOI: 10.1038/jcbfm.1988.35
- [5] Nikolov NA, Makeev SS, Novikova TG, Chebotariova LL, Globa MV, Unevich OA, et al. Determination of absolute cerebral blood flow scintigraphy with lipophilic radiopharmaceutical. *Meditsinskaya Fizika*. 2018;79:36-45.
- [6] Saxena P, Pavel DG, Quintana JC, Horwitz B. An automatic threshold-based scaling method for enhancing the usefulness of Tc-HMPAO SPECT in the diagnosis of Alzheimer's disease. In: Wells WM, Colchester A, Delp S, editors. *Medical image computing and computer-assisted intervention – MICCAI'98*. MICCAI 1998. Lecture notes in computer science, vol. 1496. Berlin Heidelberg: Springer; 1998. p. 623-30. DOI: 10.1007/BFb0056248
- [7] Fahey FH, Bom HH, Chiti A, Choi YY, Huang G, Lassmann M, et al. Standardization of administered activities in pediatric nuclear medicine: A report of the first nuclear medicine global initiative project, Part 2—Current standards and the path toward global standardization. *J Nucl Med*. 2016 Jul;57(7):1148-57. DOI: 10.2967/jnumed.115.169714
- [8] Kapucu ÖL, Nobili F, Varrone A, Booi J, Vander Borgh T, Nägren K, et al. EANM procedure guideline for brain perfusion SPECT using <sup>99m</sup>Tc-labelled radiopharmaceuticals, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009 Dec;36(12):2093-102. DOI: 10.1007/s00259-009-1266-y
- [9] Diaz MP, Rizo OD, Dñaz AL, Aparicio EE, Dñaz RR. Activity optimization method in SPECT: A comparison with ROC analysis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Dec;7(12):947-56. DOI: doi.org/10.1631/jzus.2006.B0947
- [10] Jang MY, Park CR, Kang S, Lee Y. Experimental study of the fast non-local means noise reduction algorithm using the Hoffman 3D brain phantom in nuclear medicine SPECT image. *Optik*. 2020 Dec;224:165440. DOI: 10.1016/j.ijleo.2020.165440
- [11] Modzelewski R, Janvresse E, de la Rue T, Vera P. Comparison of heterogeneity quantification algorithms for brain SPECT perfusion images. *EJNMMI Res*. 2012;2(1):40. DOI: 10.1186/2191-219X-2-40
- [12] Lyra M, Ploussi A. Filtering in SPECT image reconstruction. *Int J Biomed Imaging*. 2011;2011:1-14. DOI: 10.1155/2011/693795
- [13] Bruyant PP. Analytic and iterative reconstruction algorithms in SPECT. *J Nucl Med*. 2002 Oct;43(10):1343-58.
- [14] Minoshima S, Maruno H, Yui N, Togawa T, Kinoshita F, Kubota M, et al. Optimization of Butterworth filter for brain SPECT imaging. *Ann Nucl Med*. 1993 Jun;7(2):71-7. DOI: 10.1007/BF03164571
- [15] Van Laere K, Koole M, Lemahieu I, Dierckx R. Image filtering in single-photon emission computed tomography: principles and applications. *Comput Med Imaging Graph*. 2001 Mar;25(2):127-33. DOI: 10.1016/S0895-6111(00)00063-X
- [16] Liu H-G, Harris JM, Inampudi CS, Mountz JM. Optimal reconstruction filter parameters for multi-headed brain SPECT: Dependence on count activity. *J Nucl Med Technol*. 1995;23:251-7.
- [17] Dong X, Saripan M, Mahmud R, Mashohor S, Wang A. Determination of the optimum filter for <sup>99m</sup>Tc SPECT breast imaging using a wire mesh collimator. *Pak J Nucl Med*. 2017;7(1):9-15. DOI: 10.24911/PJNMed.7.2
- [18] Onishi H, Matsutake S, Amijima H. Validation of optimal cut-off frequency using a Butterworth filter in single photon emission computed tomography reconstruction for the target organ: Spatial domain and frequency domain. *J Faculty of Health and Welfare Prefectural University of Hiroshima*. 2010;10(1): 27-36.
- [19] Sowa-Staszczak A, Lenda-Tracz W, Tomaszuk M, Głowa B, Hubalewska-Dydejczyk A. Optimization of image reconstruction method for SPECT studies performed using [<sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC] octreotate in patients with neuroendocrine tumors. *Nucl Med Rev*. 2013 Feb 8;16(1):9-16. DOI: 10.5603/NMR.2013.0003
- [20] King MA, Glick SJ, Penney BC, Schwinger RB, Doherty PW. Interactive visual optimization of SPECT prereconstruction filtering. *J Nucl Med*. 1987;28:1192-8.

- [21] Huang C, Wu J, Cheng K, Pan L. Optimization of imaging parameters for SPECT scans of [<sup>99m</sup>Tc]TRODAT-1 using Taguchi analysis. *PLoS ONE*. 2015 Mar 19;10(3):e0113817. DOI: 10.1371/journal.pone.0113817
- [22] Beekman FJ, Slijpen ETP, Niessen WJ. Supervised diffusion parameter selection for filtering SPECT brain images. In: ter Haar Romeny B, Florack L, Koenderink J, Viergever M, editors. *Scale-space theory in computer vision. Scale-space 1997. Lecture notes in computer science*, vol. 1252. Berlin, Heidelberg: Springer; 1997. p. 164–75. DOI: 10.1007/3-540-63167-4\_48
- [23] Razifar P, Sandström M, Schnieder H, Långström B, Maripuu E, Bengtsson E, et al. Noise correlation in PET, CT, SPECT and PET/CT data evaluated using autocorrelation function: a phantom study on data, reconstructed using FBP and OSEM. *BMC Med Imaging*. 2005 Dec;5(1):5–23. DOI: 10.1186/1471-2342-5-5
- [24] Brambilla M, Cannillo B, Dominietto M, Leva L, Secco C, Inglese E. Characterization of ordered-subsets expectation maximization with 3d post-reconstruction gauss filtering and comparison with filtered backprojection in <sup>99m</sup>Tc SPECT. *Ann Nucl Med*. 2005 Apr;19(2):75–82. DOI: 10.1007/BF03027384
- [25] Morano GN, Seibyl JP. Technical overview of brain SPECT imaging: improving acquisition and processing of data. *J Nucl Med Technol*. 2003 Dec;31(4):191–5; quiz 202–3.
- [26] Beekman FJ, Slijpen ETP, Niessen WJ. Selection of task-dependent diffusion filters for the post-processing of SPECT images. *Phys Med Biol*. 1998 Jun 1;43(6):1713–30. DOI: 10.1088/0031-9155/43/6/024
- [27] Vija AH, Cachovan M. Multi-modal reconstruction in brain perfusion SPECT. *J Nucl Med*. 2019;60 (supplement 1):1362.
- [28] Li T, Wang Y. Multiscaled combination of MR and SPECT images in neuroimaging: A simplex method based variable-weight fusion. *Comput Methods Programs Biomed*. 2012 Jan;105(1):31–9. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.07.012
- [29] Liu Z, Song Y, Sheng VS, Xu C, Maere C, Xue K, et al. MRI and PET image fusion using the nonparametric density model and the theory of variable-weight. *Comput Methods Programs Biomed*. 2019 Jul;175:73–82. DOI: 10.1016/j.cmpb.2019.04.010
- [30] Novikova T, Nikolov N, Makeev S, Steblyuk V. SPECT in the diagnosis of cerebral changes in patients in the intermediate and long-term periods of combat explosive mild traumatic brain injury. *Eurasian J Oncol*. 2020;8(3):260–70. Available from: [https://onco.recipe.by/en/?editions=2020-tom-8-n-3&group\\_id=item\\_0&article\\_id=line\\_3](https://onco.recipe.by/en/?editions=2020-tom-8-n-3&group_id=item_0&article_id=line_3)
- [31] Zheng W, Li S, Krol A, Ross Schmidlein C, Zeng X, Xu Y. Sparsity promoting regularization for effective noise suppression in SPECT image reconstruction. *Inverse Problems*. 2019 Nov 1;35(11):115011. DOI: 10.1088/1361-6420/ab23da

М.О. Ніколов<sup>1,4</sup>, С.С. Макеєв<sup>2</sup>, О. Коростинська<sup>3</sup>, Т.Г. Новікова<sup>2</sup>, Є.С. Крюкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

<sup>2</sup>ДУ “Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України”, Київ, Україна

<sup>3</sup>Столичний університет Осло, Осло, Норвегія

<sup>4</sup>ДУ “Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН України”, Київ, Україна

#### ФІЛЬТР ГАУСА ДЛЯ ОФЕКТ-ЗОБРАЖЕНЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

**Проблематика.** Наявність шумової складової на 3D-зображеннях однофотонної емісійної комп’ютерної томографії (ОФЕКТ) головного мозку суттєво спотворює функцію розподілу ймовірностей (ФРЙ) швидкості радіоактивного рахунку. Наявність шумів і подальша фільтрація даних, що базується на суб’єктивній оцінці якості зображень, значно впливають на розрахунок об’ємного мозкового кровотоку та значення асиметрії накопичення радіофармпрепарату в мозку.

**Мета.** Розробка методу оптимальної ОФЕКТ-фільтрації зображень головного мозку з ліпофільними радіофармпрепаратами на основі фільтра Гауса (ГФ) для подальшої сегментації зображень пороговим методом.

**Методика реалізації.** В роботі аналізувалися ОФЕКТ-зображення водного фантому та головного мозку пацієнтів з <sup>99m</sup>Tc-ГМПАО. Розроблено методику штучного додавання спекл-шуму до умовно ідеальних даних для визначення оптимальних параметрів згладжування ОФЕКТ на основі ФГ. Кількісним критерієм оптимального згладжування слугувало середньоквадратичне відхилення між ФРЙ швидкості радіоактивного рахунку між згладженими зображеннями та умовно ідеальним.

**Результати.** Показано, що максимальна швидкість радіоактивного рахунку ОФЕКТ-зображення має екстремум при зміні стандартного відхилення ГФ за просторового порядку фільтра в діапазоні 0,3–0,4 пікселя. Чим більша шумова складова на зображеннях ОФЕКТ, тим більш квазілінійно змінюється відповідна швидкість. Ця залежність дає змогу визначити оптимальні параметри згладжування. Застосування розробленої методики згладжування дає можливість відновити функцію розподілу ймовірностей швидкості радіоактивного рахунку (гістограма розподілу) з точністю до 5–10 %. Це дає змогу стандартизувати ОФЕКТ-зображення головного мозку з точки зору просторового розподілу препарату в мозку.

**Висновки.** Представлені в роботі результати досліджень вирішують конкретне завдання – відновлення гістограми розподілу радіофармпрепаратів в мозку для коректної кількісної оцінки об’ємного мозкового кровотоку. На відміну від відомих публікацій про фільтрацію даних ОФЕКТ, у роботі враховується, що вихідні томографічні дані є 3D, а не представлені 2D-зрізами, і містять не тільки рівномірний випадковий гаусівський шум, але й виражену спекл-складову.

**Ключові слова:** емісійна комп’ютерна томографія; ОФЕКТ; мозковий кровоток; радіоактивний рахунок; фільтр Гауса; оптимальна фільтрація; радіофармпрепарати; <sup>99m</sup>Tc-ГМПАО.

Н.А. Николов<sup>1,4</sup>, С.С. Макеев<sup>2</sup>, О. Коростинская<sup>3</sup>, Т.Г. Новикова<sup>2</sup>, Е.С. Крюкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>КПИ им. Игора Сикорского, Киев, Украина

<sup>2</sup>ГУ "Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова НАМН Украины", Киев, Украина

<sup>3</sup>Столичный университет Осло, Осло, Норвегия

<sup>4</sup>ГУ "Институт медицины труда имени Ю.И. Кундиева НАМН Украины", Киев, Украина

### ФИЛЬТР ГАУССА ДЛЯ ОФЭКТ-ИЗОБРАЖЕНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

**Проблематика.** Наличие шумовой составляющей на 3D-изображениях однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) головного мозга существенно искажает функцию распределения вероятностей (ФРВ) скорости радиоактивного счета. Наличие шумов и последующая фильтрация данных, основанная на субъективной оценке качества изображений, оказывают значительное влияние на расчет объемного мозгового кровотока и значения асимметрии накопления радиофармпрепарата в мозге.

**Цель.** Разработка метода оптимальной ОФЭКТ-фильтрации изображений головного мозга с липофильными радифармпрепаратами на основе фильтра Гаусса (ГФ) для последующей сегментации изображения пороговым методом.

**Методика реализации.** В работе анализировались ОФЭКТ-изображения водного фантома и головного мозга пациентов с <sup>99m</sup>Tc-ГМПАО. Разработана методика искусственного добавления спекл-шума к условно идеальным данным для определения оптимальных параметров сглаживания ОФЭКТ на основе ФГ. Количественным критерием оптимального сглаживания служило среднеквадратичное отклонение между ФРВ скорости радиоактивного счета между сглаженными изображениями и условно идеальным.

**Результаты.** Показано, что максимальная скорость радиоактивного счета ОФЭКТ-изображения имеет экстремум при изменении стандартного отклонения ГФ для пространственного порядка фильтра в диапазоне 0,3–0,4 пикселя. Чем больше шумовая составляющая на изображениях ОФЭКТ, тем более квазилинейно изменяется соответствующая скорость. Эта зависимость позволяет определить оптимальные параметры сглаживания. Применение разработанной методики сглаживания позволяет восстановить функцию распределения вероятностей скорости радиоактивного счета (гистограмму распределения) с точностью до 5–10 %. Это позволяет стандартизировать ОФЭКТ-изображения головного мозга с точки зрения пространственного распределения препарата в мозге.

**Выводы.** Представленные в данной работе результаты исследований решают конкретную прикладную задачу – восстановление гистограммы распределения радиофармпрепаратов в мозге для корректной количественной оценки объемного мозгового кровотока. В отличие от известных публикаций про фильтрацию данных ОФЭКТ, в работе учитывается, что исходные томографические данные являются 3D, а не представлены 2D-срезами, и содержат не только равномерный случайный гауссовский шум, но и выраженную спекл-составляющую.

**Ключевые слова:** эмиссионная компьютерная томография; ОФЭКТ; мозговой кровоток; радиоактивный счет; фильтр Гаусса; оптимальная фильтрация; радифармпрепараты; <sup>99m</sup>Tc-ГМПАО.

## USE OF HIGHLY DISPERSED SILICA IN BIOTECHNOLOGY OF COMPLEX PROBIOTIC PRODUCT BASED ON BIFIDOBACTERIA

S.G. Danylenko<sup>1</sup>, L.V. Marynchenko<sup>1,2\*</sup>, V.V. Bortnyk<sup>2</sup>, O.I. Potemka<sup>1</sup>, O.I. Nizhelska<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Food Resources, NAAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Applied Physics, NAS of Ukraine, Sumy, Ukraine

\*Corresponding author: lolitamar@ukr.net

Received 13 December 2021; Accepted 11 February 2022

**Background.** The probiotics immobilization technology is one of the most effective ways for controlled and continuous delivery of viable cells into the intestine. It is well known that multifaceted physiological roles of bifidobacteria are to normalize and stabilize the microbiocenosis, to form intestine colonization resistance, to synthesis amino acids, proteins and vitamins, to maintain non-specific resistance of the organism and so all. Such a wide range of positive effects on the macroorganism allows us to consider bifidobacteria as a basis for functional immobilized healthcare products development.

**Objective.** Taxonomic position determination of the *Bifidobacterium longum* strain selected for immobilization, study of the viability of this bifidobacteria strain in a complex probiotic product based on highly dispersed silica in simulated gastrointestinal tract's conditions and after freeze-drying.

**Methods.** The production strain *Bifidobacterium longum* IMV B-7165 from the Institute of Food Resources of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine collection of industrial strains has been used in the study. It was isolated from the healthy human infant's gastrointestinal tract.

Commonly used bioinformatics, microbiological, biotechnological and statistical methods have been applied.

**Results.** The best alignments for the sequence of bifidobacteria isolate "4202" 16S rRNA (it was previously deposited as *Bifidobacterium longum* IMV B-7165) and classic dendrograms based on these results were performed. According to the results of microscopic studies of samples of microorganisms with highly dispersed silica products ("Enterosgel", "Sillard P" and "Toxin.Net") it was found that the immobilization of the *Streptococcus thermophilus* and bifidobacteria cultures did not differ fundamentally. To study the immobilization effect on the bifidobacteria preservation and properties the following carriers were used: "Enterosgel", "Toxin.NET" and "Sillard P". The survival of immobilized bifidobacteria was further studied in simulated gastrointestinal conditions: immobilized cells are better protected from acid and bile, although with increasing acidity, survival decreases in both control and immobilized cells.

**Conclusions.** The taxonomic position of a bifidobacterial isolate from the healthy human infants used in immobilization studies was clarified (*Bifidobacterium animalis subsp lactis*). Under the simulated conditions of the upper gastrointestinal tract in the case of acid and bile impact, the best survival was demonstrated by immobilized cultures of bifidobacteria together with the Enterosgel sorbent (a content of 10% by weight of the culture). The survival of immobilized preparations after freeze-drying was slightly reduced in the case of immobilization on the "Enterosgel" and "Toxin.NET" samples of enterosorbents (a content from 15% to 25% by weight of the culture). The best results were observed in the case of immobilization of bifidobacteria with 5% content of the "Toxin.NET" enterosorbent (enterosgel + inulin).

**Keywords:** bifidobacteria; highly dispersed silica; taxonomic position; immobilization; healthcare products.

### Introduction

The intestinal microbiota has a number of important functions in the life of the human body: protective, digestive, metabolic and immunomodulatory. The use of probiotic for the normal microbiota of the gastrointestinal tract (GIT) maintenance is a useful method of correction. But unfortunately, as it is well known only tenth of all probiotic microorganisms attach to the intestinal wall [1, 2]. The levels of bifidobacteria and lactobacilli in the intestine are the indicators of the organism's microecological status. Therefore, control-

led delivery of living cells (as well as their duodenal transplantation) and their release into the gastrointestinal tract is a promising area for studies [3]. One type of such delivery is the use of carrier matrices that bind to the target component and prevent its premature release or destruction. Such materials can be activated carbon, lignin, chitin, cellulose, sodium alginate gel, silicon dioxide, aluminium oxide with carbon film, and others. It is known that complex preparations of probiotic cultures, immobilized on carriers, better tolerate both conditions during drying (lyophilized or spray dryer) and realised in the gastrointestinal tract [4].

It has been shown that some methods of probiotic bacteria microencapsulation, in particular in alginate gel, are able to prevent their damage in fermented milk products, improve their viability and maintain a high level of therapeutic activity during the usage period [5]. Other variants of encapsulated materials such as anhydrous milk fat are also investigated [6].

Sorbex (activated charcoal) immobilized and frozen probiotics promoted a faster colon microbiota normalization of rats with chemotherapeutic dysbiosis and elimination of pathogenic microbiota in comparison with the action of native probiotics, enterosorbents and probiotic-sorbent mixtures.

The efficacy of *Lactobacillus rhamnosus* encapsulation into mesoporous alginate-silica with modeling the existence of cells in the gastrointestinal tract was also demonstrated. The viability of microorganisms increased with the addition of buffer. Mesoporosity (50 nm) of silica promoted the nutrient metabolites higher permeability and, consequently, higher cell growth without their release [8]. Some attempts have been made to cultivate probiotic strains with the addition of silica. In particular, it was shown that the addition of 2% "Aerosil A300" to the culture medium promoted biomass increase up to 40–75%, with simultaneous acidity increasing, while antagonistic activity of *L. plantarum* and *B. adolescentis*, *L. lactis* probiotic strains did not change significantly [9].

Highly dispersed silica ("Enterosgel", "Atoxyl", "Sylax", "Aquasil", etc.) is approved for use as enterosorbent, in poisoning treatment to reduce intoxication, as a component of some ointments [10]. Dispersed silica is of interest due to its biocompatibility, safety and high adsorption properties (mainly due to silanol groups). Recently, interest in mesoporous silicas is growing again due to their possible use for the development of drugs targeted delivery means, implants' antibiotic film coatings, tumors diagnostics methods using fluorescent properties of Cornelldots (C-dots) [11].

Scientific publications data allows linking the biological consequences of cell-silica interactions with such parameters as particle shape and size, surface area, number of silanol groups, degree of hydrophilicity, crystallinity index, presence of atoms of other elements, surface ability to generate oxygen radicals and selective adsorption of biologically significant molecules.

The long-term study of highly dispersed silica in different doses did not reveal any significant toxicity. But it was noted that crystalline silica physicochemical modification, changing particle

size and surface, could significantly increase biocompatibility [12]. The interaction between highly dispersed silica and cells has been studied in view of possible nanoparticles toxicity at different ways of administration: inhalation, intradermal penetration, conjunctival instillation and parenteral penetration. Experiments have shown a highly safety of this compound (class IV of toxicity) [13].

Therefore, there are reasonable assumptions to suppose that highly dispersed silica can be a carrier for a complex probiotic healthcare products with prolonged action throughout the entire gastrointestinal tract.

There are a number of technological problems in the complex probiotic products development: silica optimal forms selection (nano-, highly dispersed, mesoporous, etc.) and their ratios with probiotic cultures, possible need to modify the silica surface, choice of product procedures, buffers, drying and storage regimens, etc.

Previously, the properties of complex products of probiotic monocultures *Streptococcus thermophilus* IMV-7249, *Bifidobacterium longum* IMV 7033, immobilized on xerogel "Sillard P" and modified hydrogel "Enterosgel" were studied. The best survival results were shown for *S. thermophilus*. Bifidobacteria of the selected strain were more sensitive to the hemolytic action of highly dispersed silica [14]. Bifidobacteria inhabit newborns' intestines during breastfeeding (from mother's milk) and, entering into a stable symbiosis with these tissues, accompany the person throughout life, causing a beneficial effect on health [15]. It is bifidobacteria that play a significant role in the normal development of microbiota in the human infants, preventing dysbiosis, restoring normal microflora after candidiasis, reducing the ability of the intestine to absorb amines, which increase blood pressure in the elderly. These and other useful properties of bifidobacteria determine the desire to include it into complex healthcare product immobilized on silica enterosorbents.

Among antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory and antiviral drugs with native bifidobacteria cells at present such metabolic drugs design involves the development of medicines containing biologically active metabolic products and separate structural components of probiotic cells [16], as even cells fragments are considered useful in terms of their positive effect on the body.

Therefore, the development of effective drugs based on probiotic strains of bifidobacteria for the formation of beneficial intestinal microbiota and microbiome therapy is an urgent task.



The *aim* of the study: taxonomic position determination of the *Bifidobacterium longum* strain selected for immobilization, study of the viability of a bifidobacteria and highly dispersed silica complex healthcare products in simulated gastrointestinal tract's conditions and after freeze-drying.

## Materials and methods

The production strain *Bifidobacterium longum* IMV B-7165 from the collection of industrial strains of Institute of Food Resources of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine has been used in the study. It was isolated from the healthy human infant's gastrointestinal tract. To obtain biomass, cultivation was performed on Blaurock medium for 20–24 hours at a temperature of  $37 \pm 1$  °C.

**Clarification of the taxonomic position of the selected strain.** Phylogenetic analysis of the selected strain 16S rRNA sequence was performed using BLAST software [17] and included detecting homologues and constructing a classical dendrogram of evolutionary relationships.

**Sorbents.** Commercial products "Enterogel" (PJSC "ENVIRONMENTAL PROTECTION FIRM "CREOMA-PHARM", Ukraine), "Toxin.NET" (with inulin) (IlanPharm, Ukraine) and test item "Sillard P" produced by the OO Chuika Institute of Surface Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine (trade name "Silix" OJSC "Biopharma") were used as highly dispersed silica sorbents.

**Microscopy.** To visualize *Bifidobacterium* microorganisms' sorption on "Toxin.NET", "Enterogel", "Sillard P" sorbents microscopically bacterial culture and sorbents were mixed at room temperature until homogeneity. Samples were prepared for immersion microscopy with gentian violet staining,  $\times 400$ . To obtain  $\times 1000$  microphotographs, the drop was dried on slide and examined in reflected light by microscope AXIO Observer A1M (Carl Zeiss company) with TopView 1000 camcorder.

**Bifidobacteria immobilization on sorbents.** The required amount of sorbent 1, 2, 3 and 5 g was added into flasks with 20 ml of bacterial suspension after cultivation (without centrifugation or after centrifugation) and stirred for 3 h at 37 °C for the most complete sorption on cells.

**Freeze-drying of the complex probiotic product.** To study the bifidobacteria stability after immobilization and freeze-drying, 2 ml samples were added to vials for freeze-drying. To protect the samples during freeze-drying special protective medium

(sucrose 10%, sodium citrate 5%, skimmed milk powder 5%) was also added in ratio 1:2.

Drying was carried out on a freeze dryer TG15 in the following modes:

- temperature at the beginning of the process  $-(-60 \pm 2)$  °C for 17 h;
- temperature at the end of the process  $+(30 \pm 2)$  °C for 11 h;
- residual pressure  $\leq 13.3.103$  Pa;
- time of the process: 28 h.

After drying, samples dilution was performed into tubes with Blaurock medium.

**Viability control.** Viability control was carried out by Koch dish method in 3 days – via colonies counting after applying the appropriate dilutions on Petri dishes with hydrolyzed agar and cultivating at a temperature of 37 °C.

**Modeling the upper gastrointestinal tract conditions [18].** The bifidobacterial preparations with 5% and 10% sorbent concentrations were exposed to hydrochloric acid at pH 2 and pH 3, which corresponds to the human gastric juice acidity. For a clear confirmation of the pH value, it was adjusted to 2.0 and 3.0 by adding different volumes of 1 moles/l HCl and 5 mols/l HCl solutions. After 3 hours at 37 °C application on Blaurock solid medium was carried out. The colonies were counted on the third day.

To reproduce the conditions of the duodenum bifidobacterial complex products with 5% and 10% sorbent concentrations and control samples of bifidobacteria culture were applied on Blaurock medium with 20%, 40% and 60% of medical bile and kept at 37 °C for 3 h. The colonies were counted on the third day.

**Statistical methods.** All analyzes were repeated 3 times and performed in duplicate. The obtained data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and analyzed by Microsoft Excel 2010 software (Microsoft, Redmond, USA). Differences were considered to be statistically significant at  $p < 0.05$ .

The authors followed bioethical guidelines and recommendations of the International Committee of Medical Journals Editors ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

## Results

**Taxonomic position determination of the Bifidobacterium longum strain selected for immobilization.** Bifidobacterial isolate "4202", deposited as *Bifidobacterium longum* IMV B-7165, 16S rRNA sequencing and decoding were carried out.

Using BLAST, with a universal primer 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 (8-27) for 16S rRNA, phylogenetic analysis of this isolate section was performed. Results of sequence alignment of bifidobacterial isolate 16S rRNA allowed to suppose that the tested isolate was phylogenetically closer to *Bifidobacterium animalis subsp lactis* than to *Bifidobacterium longum*, to which it was previously attributed due to its physiological, biochemical and cultural characteristics, which might be due to the methodological possibilities available at the moment.

Indeed, the highest sequence "4202" alignment score, used for the studies, calculated for 4 strains of *Bifidobacterium animalis subsp lactis* was 968 (Fig. 1a), while for *Bifidobacterium longum* – 893 (Fig. 1b).

The evolutionary distance calculation confirms this conclusion, because for *Bifidobacterium longum* it is an order of magnitude greater than for *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (Fig. 2).

**Microscopic studies of silica samples with probiotic strains.** Samples of *Bifidobacterium* with "Enterogel", "Sillard P" and "Toxin.NET" were examined microscopically by different methods (with immersion and in reflected light) (Figs. 3, 4). The resulting images showed that the bacterial cells were immobilized on different silica samples. It should be noted that the character of previously

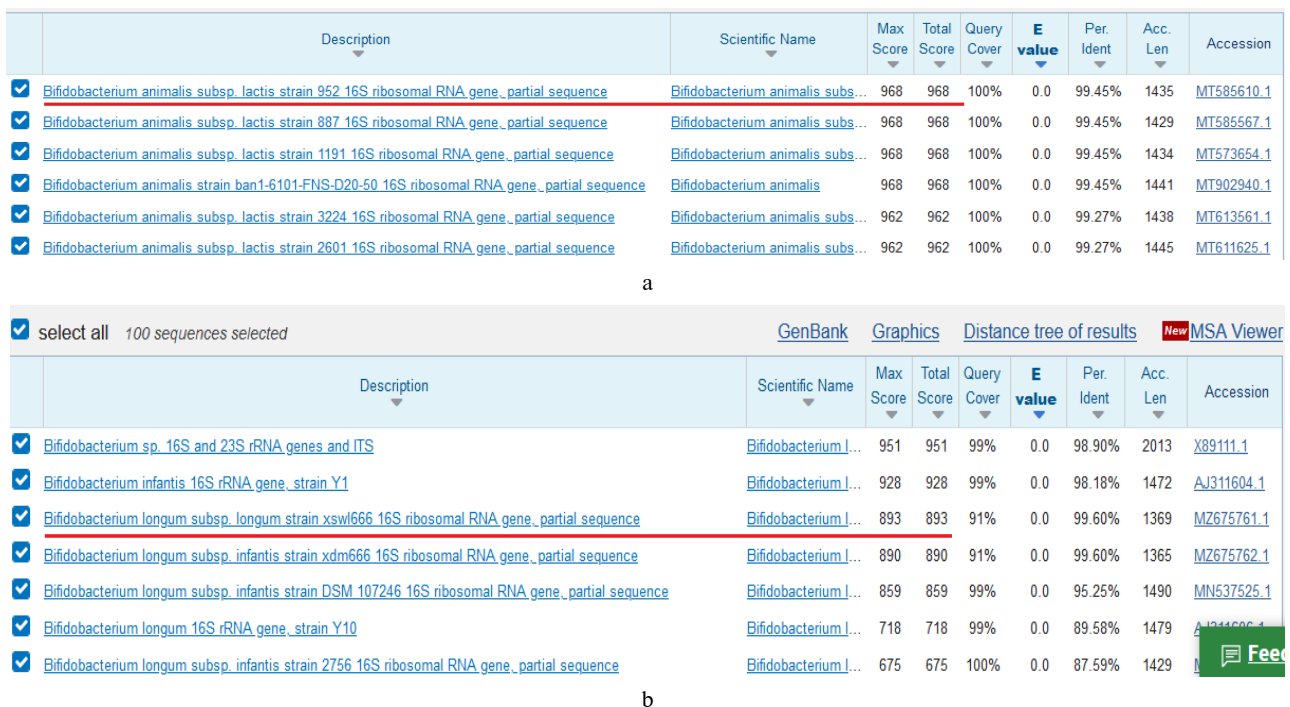
studied *Streptococcus thermophilus* culture immobilization on "Enterogel" and "Sillard P" (Fig. 6\* [14]), did not fundamentally differ from immobilization of *Bifidobacterium*. Cells mainly were clustered around sorbents particles, which could be the evidence of their possible direct interactions.

**Determination of sorbed bifidobacteria viability.**

A key step in the development of complex products based on immobilized cells is a choice of an effective carrier, which defines the effectiveness of microorganisms' protection from the negative effects of aggressive liquids. In order to study the effect of immobilization on the preservation and properties of bifidobacteria, were used the following carriers: "Enterogel", "Toxin.NET" and "Sillard P".

For this aim, a suspension of the culture fluid with hydrogels was kept for 3 hours at a temperature of 37 °C (Fig. 5) with periodic stirring, which partially mimicked the research of other authors on the introduction of sorbents in the culture medium during cultivation.

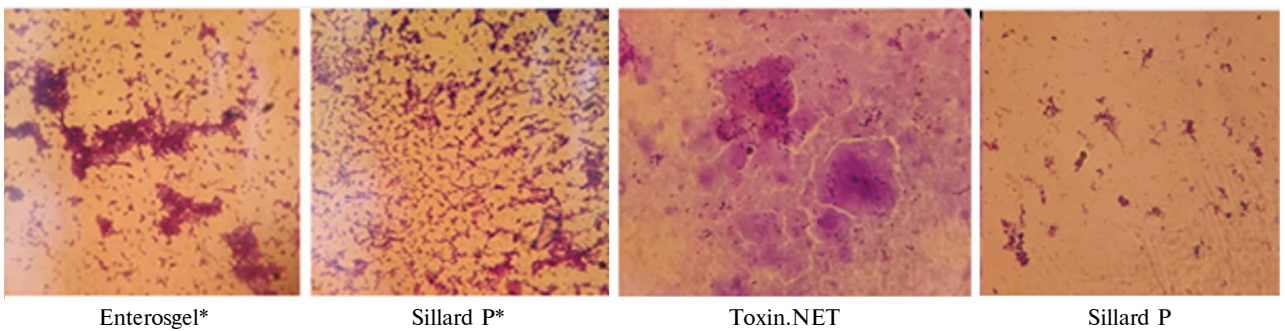
**Immobilized bifidobacteria vitality rate at gastrointestinal tract conditions modeling.** The main aim of probiotics immobilization is their cells protection during the upper gastrointestinal tract passage. The hydrochloric acid action is extremely destructive for probiotics, which is confirmed by the control samples (without immobilization) vitality rates (Fig. 6). Our results show that immobilized cells



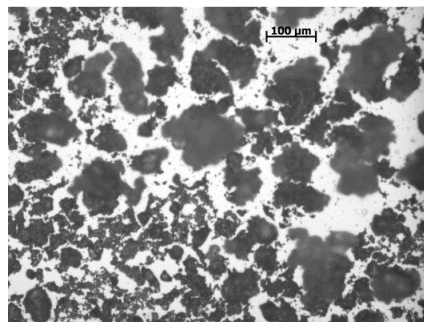
**Figure 1:** The results of the best alignments for the sequence of isolate "4202" 16S rRNA: (a) with the entire base of nucleotide sequences; (b) with *Bifidobacterium longum*



**Figure 2:** Classic dendrograms of evolutionary relationships based on the results of alignment for the sequences of bifidobacteria isolate "4202" 16S rRNA: (a) with the entire base of nucleotide sequences; (b) with *Bifidobacterium longum*



**Figure 3:** Microscopic image of streptococci (*Streptococcus thermophilus* – previous studies [14]) and bifidobacteria cultures with sorbents (×400)



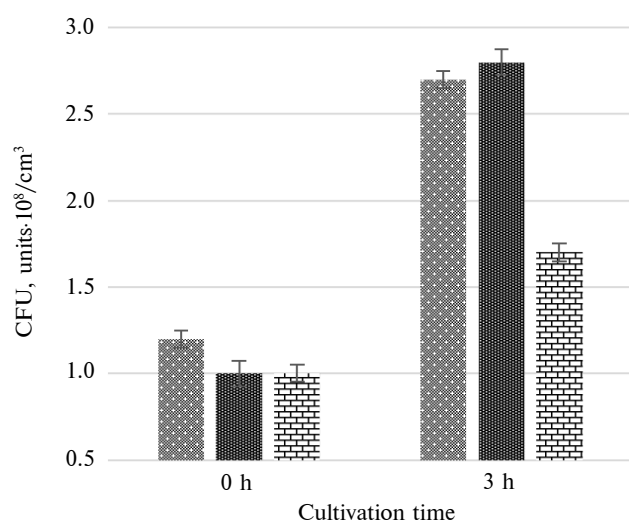
**Figure 4:** Microscopic image of *Bifidobacterium* cells sorbed on "Enterosgel" (reflected light, ×1000)

are better protected from acid. But it could be seen that with increasing acidity, both in control and immobilized cells vitality rates decrease. Thus, at pH 2 the number of bifidobacteria (immobilized with 5% and 10% sorbent) is 11 times lower than at pH 3. It is also noticeable that the difference in vitality rates for 5% and 10% sorbent – does not exceed the method error.

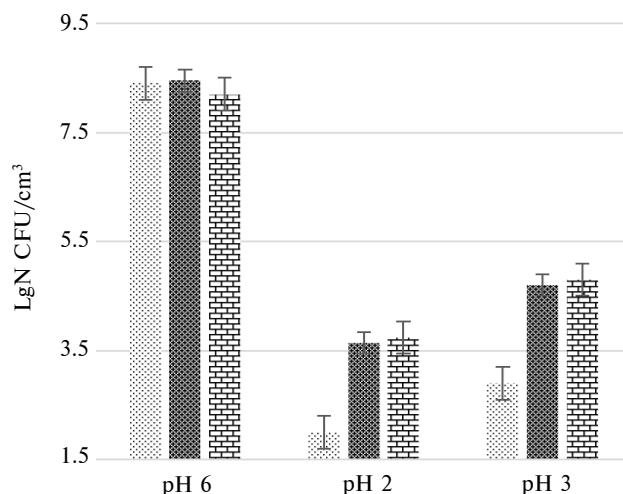
After passing the stomach with an extreme acidic environment, probiotic cultures together with food or in the form of a freeze-dried product enter into the duodenum, where are the bile ducts from the liver. Bile can also significantly destroy the microorganisms' cells, so the investigation of

immobilized and intact bifidobacteria vitality rates in the presence of bile is of special interest. As can be seen from the obtained results test samples incubation for 3 h in medium with different concentrations of bile, their vitality rates are significantly reducing in control samples (Fig. 7). In the case of sorbent-immobilized samples of bifidobacteria, viability was higher. It must be noted that at all studied concentrations (20%, 40%, 60%) vitality rates of bifidobacteria, which contained 10% of the "Enterosgel", was significantly higher than in the control.

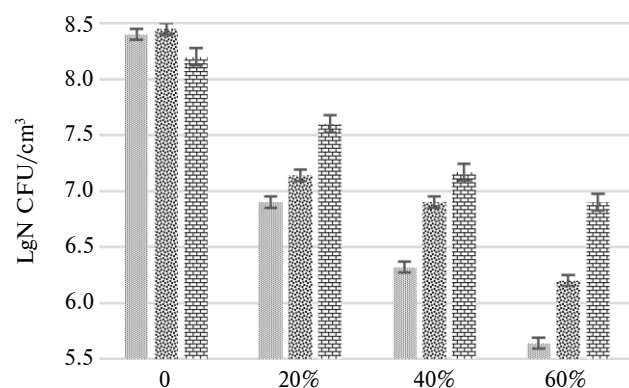
The vitality rate of immobilized culture with freeze-drying (Fig. 8) tended to decrease with



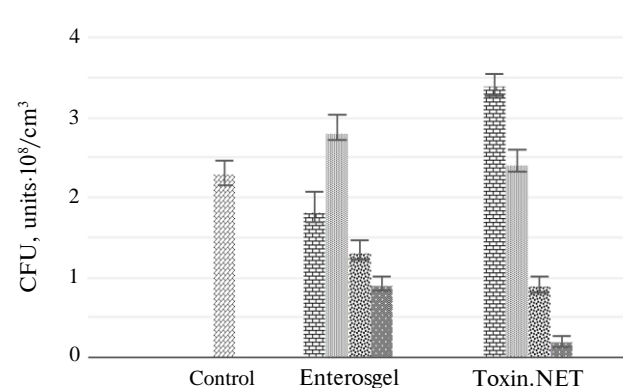
**Figure 5:** Diagram of the "Enterosgel"-immobilized bifidobacteria vitality rate: ■ – control samples without sorbent, ■ – samples with a 5% sorbent content, ■ – samples with a 10% sorbent content



**Figure 6:** Vitality rates of "Enterosgel"-immobilized (5% and 10%) bifidobacteria probiotic strain during incubation at pH 6.0, pH 2.0 and pH 3.0, 3 h, 37 °C: ■ – control samples without sorbent, ■ – samples with a 5% sorbent content, ■ – samples with a 10% sorbent content



**Figure 7:** Vitality rates of "Enterosgel"-immobilized (5% and 10%) bifidobacteria probiotic strain during incubation at bile concentrations of 20%, 40% and 60%, 3 h, 37 °C: ■ – control samples without sorbent, ■ – samples with a 5% sorbent content, ■ – samples with a 10% sorbent content



**Figure 8:** Vitality rates of bifidobacteria after freeze-drying in the case of adding from 5% to 25% of drugs "Enterosgel" and Toxin.NET: ■ – samples with a 5% sorbent content; ■ – samples with a 10% sorbent content; ■ – samples with a 15% sorbent content; ■ – samples with a 20% sorbent content

sorbent content increasing up to 25%. Such results confirm our previous data on the better survival of other lactic acid bacteria in combination with hydro gel ("Enterosgel") and not with xerogel ("Sillard P") [14]. On the whole the best results among the tested sorbents for bifidobacteria were observed in the case of culture immobilization with 5% of "Toxin.NET" –  $3.4 \pm 0.7 \times 10^8$  CFU in comparison with control –  $2.3 \pm 0.7 \times 10^8$  CFU. This effect could be realized due to protective action of inulin, which is a part of this preparation.

## Discussion

In order to protect probiotic microbiota from bactericidal effects in the upper gastrointestinal tract we consistently used the following approaches: resistant strains of bifidobacteria selection (to provide ability to survive in acidic stomach juice and in aggressive mediums of the small intestine) and further their immobilization on different carriers' samples study.

In the development of biological products immobilized forms, the most important point is the choice of sorbent-carrier. Modern enterosorbents should be non-toxic, non-traumatic to the gastrointestinal mucosa, with high sorption capacity. Such properties have preparations of highly dispersed silica "Sillard P" ("Silix"), "Enterosgel" and "Toxin.NET", which are approved for enteral use.

Bifidobacteria introduction into the intestine contributes to its contents quantitative and qualitative normalization and stimulates the reparative process of the mucous membrane. Frequent dysbioses in children with dietary disorders caused by infections or antibiotics administration determined the choice of bifidobacteria (isolated from the gastrointestinal tract of the healthy human infants) as an object of study. It was confirmed that the provided 16S rRNA sequence of such an isolate belongs taxonomically to the genus *Bifidobacterium*, which was characterized by a high content of GC-nucleotides and gram-positive cell wall structure. Our bioinformatics analysis of this nucleotide sequence showed the greatest phylogenetic affinity of tested isolate to *Bifidobacterium animalis subsp lactis*, and not to the species *Bifidobacterium longum*, under which name this strain was deposited at the DK Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU.

As can be seen from the results of the immobilization conditions determination (see Fig. 5), the chosen method of immobilization of the culture suspension (3 h at 37 °C with stirring) for 5% and

10% sorbent content do not significantly reduce vitality rates: the number of colony-forming units remains at the same level as at the control before immobilization ( $10^8$ ). This may be due to the absence of post-cultivation stress: cells remain in the culture medium at the cultivation temperature and are not washed after ultracentrifugation. The vitality rates reduction by 10% of the sorbent content is not significant given the order of numbers.

Numerous studies have focused on the resistance of immobilized probiotic microorganisms to the action of artificial environments modeling the human gastrointestinal tract conditions, as well as bacterial viability duration in food [19–21]. It was shown that immobilization of probiotic microorganisms allows to increase significantly the resistance of tested cultures to the action of these media. Immobilized preparations are superior in survival to traditional probiotics (liquid or dry cultures). It is also assumed that therapeutic and prophylactic effects of immobilized healthcare products are realized due to the combined actions of living bacteria, as well as protective and detoxifying properties of the enterosorbent itself. Immobilized bacteria are more resistant to environmental inactivating factors, including the gastrointestinal tract mediums [22].

According to many developers [23–26], sorbed products actively colonize the intestinal mucosa by creating a high local concentration of bifidobacteria, which allows them to better survive during the passage of the gastrointestinal tract and colonize its mucosa.

Our series of experiments to study the immobilized bifidobacteria acid resistance showed that the immobilization of cells on sorbents had a protective effect in conditions of low pH, and our results coincide with the results of other scientists [27].

To achieve the best result on the survival of immobilized bifidobacteria with gastrointestinal conditions modeling (pH 2, pH 3 and bile action), it seems appropriate to rationalize cell immobilization conditions and to modify the enterosorbent surface with a view to creating conditions both for sorption and protection of cells.

Regarding the decrease in the freeze-dried complex probiotic products vitality with increasing sorbent concentration, this effect is characteristic for the nanomaterial influences on living cells. It is possible that increase of surface tension contributes the destruction of the cell wall during drying. However, in our opinion, there may also be a purely methodological explanation for this fact. Cells seeded on the nutrient medium are surrounded

by sorbent particles and therefore have no physical possibility to contact to solid nutrient medium. This assumption is partly confirmed by studies of milk fermentation by a complex probiotic product which quite well "copes with the task", despite certain smaller number of living cells [14]. In a liquid medium, cells have greater access to the nutrient medium, so the functionality of the culture immobilized on the hydro gel may be better than encapsulated.

Inulin (which is a part of "Toxin.NET") helps to maintain just the bifidoflora, so this complex probiotic product was the best for preserve cells viability after freeze-drying of the immobilized test strain. For an optimal choice it is necessary to choose both concentration, and temperature, to apply other technological approaches which can influence on the choice of sorbent. Giving recommendation, the cost and availability of this sorbent must be also taken into account. So, inulin can be added into medium during immobilization simultaneously with "Enterosgel" to avoid the use of expensive pharmacopoeial healthcare product ("Toxin.NET" or similar). Furthermore, in case of cultures composition must be chosen parameters and sorbents providing the best vitality rates for each of them.

The obtained results will be used in the production of new fermenting healthcare products of the Institute of Food Resources of NAAS of Ukraine for sour milk product.

## References

- [1] Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020 Jun 30;8(1):103. DOI: 10.1186/s40168-020-00875-0
- [2] Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease. *Front Microbiol*. 2018 Aug 14;9:1835. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01835
- [3] Monsour HP Jr, Quigley EM. The microbiome: what will the future hold. *Semin Liver Dis*. 2016 Sep;36(4):354-9. DOI: 10.1055/s-0036-1594009.
- [4] Starovoitova SO. Modern aspects of technology of immobilized probiotics. *Biotechnologia Acta*. 2012;5(4):9-20.
- [5] Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J Food Sci Technol*. 2015 Aug;52(8):4679-96. DOI: 10.1007/s13197-014-1516-2
- [6] de Paiva e Silva KK, de Souza Queirós M, Ribeiro APB, Gigante ML. Modified milk fat as encapsulating material for the probiotic microorganism *Lactobacillus acidophilus* LA3. *Int Dairy J*. 2022;125:105237. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.105237
- [7] Babynets O.M. Properties of probiotics immobilized on enterosorbents after low-temperature storage. *Bull Probl Biol Med*. 2012;4(1):72-8.
- [8] Haffner FB, Diab R, Pasc A. Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Mater Sci*. 2016;3(1):114-36. DOI: 10.3934/matserci.2016.1.114
- [9] Kozlovska HV, Danylenko SG, Ibatullina FZ. Selection of protective media in the process of lyophilization of strains of bifidobacteria and lactobacilli. *Sci J Nat Univ Life Environ Sci Ukr*. 2012; 72(4):30-3.
- [10] Gorbyk PP, Pentuyk OO, Shtatko OI. Prospects for the creation of combined drugs based on highly dispersed silica. *Nanosyst Nanomater Nanotechnol*. 2008;6(1):315-330.
- [11] Kim SE, Zhang L, Ma K, Riegman M, Chen F, Ingold I, et al. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nat Nanotechnol*. 2016;11(11):977-85. DOI: 10.1038/nnano.2016.164

## Conclusions

The taxonomic position of a bifidobacteria isolate (from the healthy human infants) used in immobilization studies was determined. Using taxonomic affiliation of microorganisms' identification procedure with the BLAST software and the 16S rRNA sequence it was shown that test item has the greatest phylogenetic affinity for *Bifidobacterium animalis subsp lactis* rather than *Bifidobacterium longum*.

With the upper gastrointestinal tract conditions modeling (in the case of acidity and bile) the best vitality rate was demonstrated by bifidobacteria cultures immobilized on the sorbent "Enterosgel" with a content of 10% (by weight of the culture).

Vitality rates of bifidobacteria immobilized on highly dispersed silica after freeze-drying was slightly reduced in the case of "Enterosgel" and "Toxin.NET" with their content from 15% to 25%. The best results were observed in the case of immobilization with 5% of "Toxin.NET" (combination of "Enterosgel" with inulin).

## Interest disclosure

The authors declare no conflicts of interest to disclose.

- [12] Selvarajan V, Obuobi S, Ee PLR. Silica nanoparticles—a versatile tool for the treatment of bacterial infections. *Front Chem.* 2020 Jul 15;8:602. DOI: 10.3389/fchem.2020.00602
- [13] Zaytsev V. Complexing silicas. Synthesis, graft structure and surface chemistry. Folio: Kharkiv; 1997. 233 p.
- [14] Danylenko S, Romanchuk I, Marynchenko L, Kryzhska T, Nizhelska O, Potemaska O, et al. Immobilization of probiotic cultures with enterosorbents based on highly dispersed silica. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2021;11(2):1-4. DOI: 10.15414/jmbfs.3334
- [15] Danylenko S. Properties of microorganisms strains *L. paracasei* ssp. *paracasei* AND *B. longum* subsp. *suis*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies Ser Veterinary Sciences.* 2013;15(1):296-301.
- [16] Knysh OV, Isaenko OI, Babych YM, Kompaniets AM, Pakhomov OV, Polyanska VP, et al. Antimicrobial activity of bifidobacteria derivatives after storage in a frozen state. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2015;28(3):267-86. DOI: 10.15407/cryo28.03.237
- [17] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Blast.ncbi.nlm.nih.gov. 2022 [cited 2021 Nov 23]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [18] Boke H, Aslim B, Alp G. The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. *Arch Biol Sci.* 2010;62(2):323-8. DOI: 10.2298/abs1002323b
- [19] Guergoletto KB, Magnani M, Martin JS, Andrade CGTdJ, Garcia S. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2010;11(2):415-21. DOI: 10.1016/j.ifset.2009.11.003
- [20] Feklysova LV, Meskyna EO. A new generation of sorbed bifid probiotics in pediatric practice. *Almanac Clin Med.* 2005;8(1):329-38.
- [21] Ding WK, Shah NP. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J Food Sci.* 2007;72(9):446-50. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00565.x
- [22] Ding WK, Shah NP. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J Food Sci.* 2009;74(2):53-60. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.01030.x
- [23] Ding WK, Shah NP. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J Food Sci.* 2009;74(2):100-7. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01067.x
- [24] Jayalalitha V, Balasundaram B, Palanidurai R. In vitro assessment of microencapsulated probiotic beads. *Int J Agricult Res Rev.* 2012;2(1):1-6.

С.Г. Даниленко<sup>1</sup>, Л.В. Маринченко<sup>1,2</sup>, В.В. Бортник<sup>2</sup>, О.І. Потемська<sup>1</sup>, О.І. Ніжельська<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Інститут продовольчих ресурсів НААН України, Київ, Україна

<sup>2</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

<sup>3</sup>Інститут прикладної фізики НАН України, Суми, Україна

#### ВИКОРИСТАННЯ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ В БІОТЕХНОЛОГІЇ КОМПЛЕКСНОГО ПРОБІОТИЧНОГО ПРОДУКТУ НА ОСНОВІ БІФІДОБАКТЕРІЙ

**Проблематика.** Технологія іммобілізації пробіотиків є найбільш ефективним способом для контрольованої та безперервної доставки життєздатних клітин у кишківник. Як відомо, фізіологічна роль біфідобактерій багатопланова і полягає в нормалізації та стабілізації мікробіоценозу, формуванні колонізаційної резистентності кишківника, синтезі амінокислот, білків і вітамінів, підтримці неспецифічної резистентності організму тощо. Саме такий широкий спектр позитивного впливу на макроорганізм дає змогу розглядати біфідобактерії як основу для створення функціональних іммобілізованих здорових продуктів на їх основі.

**Мета роботи.** Визначення таксономічного положення вибраного для іммобілізації штаму біфідобактерій *Bifidobacterium longum*, дослідження виживаності біфідобактерій цього штаму в комплексному пробіотичному продукті на основі високодисперсного кремнезему за модельованих умов шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та після ліофільного висушування.

**Методика реалізації.** Використовували виробничий штам *Bifidobacterium longum* IMB B-7165 із колекції промислових штамів Інституту продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук України. Штам виділено із ШКТ здорових немовлят. Використовували загальноживані біоінформатичні, мікробіологічні, біотехнологічні та статистичні методи.

**Результати.** Виконано й показано найкращі вирівнювання для послідовності 16S рРНК ізоляту біфідобактерій “4202”, (задепонованого як *Bifidobacterium longum* IMB B-7165) та класичні дендрограми на основі цих результатів. За результатами мікроскопічних досліджень зразків мікроорганізмів із високодисперсними кремнеземовими продуктами (“Ентеросгель”, “Силлард П” і “Токсин.NET”) встановлено, що іммобілізація культури *Streptococcus thermophilus* принципово не відрізняється від іммобілізації біфідобактерій. З метою вивчення впливу іммобілізації на збереження та властивості біфідобактерій було використано такі ентеросорбенти, як “Ентеросгель”, “Токсин.NET” і “Силлард П”. Виживаність іммобілізованих біфідобактерій додатково вивчали за модельованих умов ШКТ: іммобілізовані клітини краще захищені від дії кислоти та жовчі, хоча з підвищенням кислотності виживаність падає як у контрольних, так і в іммобілізованих клітин.

**Висновки.** Уточнено таксономічне положення ізоляту біфідобактерій, виділеного з організму здорових немовлят, який використовували в дослідженнях з іммобілізації (*Bifidobacterium animalis subsp lactis*). За модельованих умов верхніх відділів ШКТ у разі дії кислоти та жовчі найкращу виживаність продемонстрували іммобілізовані культури біфідобактерій на сорбенті “Ентеросгель” із вмістом 10 % від маси культури. Виживаність іммобілізованих препаратів після ліофільного висушування незначно знижувалась у разі іммобілізації на зразках ентеросорбентів “Ентеросгель” і “Токсин.NET” за їх вмісту від 15 до 25 % від маси культури. Найкращі результати спостерігали у разі іммобілізації біфідобактерій з 5 %-вим вмістом ентеросорбенту “Токсин.NET” (ентеросгель з інуліном).

**Ключові слова:** біфідобактерії; високодисперсний кремнезем; таксономічне положення; іммобілізація пробіотиків; здорові продукти.

## DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR OBTAINING THE BIOPLASTICS BASED ON MICROBIAL BIOPOLYMERS AND LIGNIN

A.V. Yurchenko<sup>1\*</sup>, N.B. Golub<sup>1</sup>, L. Jinping<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Shandong, China

\*Corresponding author: ang.vl.yurchenko@gmail.com

Received 11 March 2022; Accepted 6 April 2022

**Background.** The ever-increasing demand for plastic polymer products with simultaneous depleting fossil fuels such as oil and natural gas, as well as the growing problem of waste disposal, creates a need to find alternative technologies that meet current trends in both environmental and economic development. Bioplastic materials that are synthesized from renewable sources and have the ability to biodegrade are considered as such an alternative. The main obstacle of modern bioplastics which makes it impossible to completely replace traditional plastics is the high cost of production. In order to reduce the cost of existing biopolymers, production waste is added to the polymer matrix. One such waste is lignin – the second most common biopolymer. An additional way to reduce the cost of production is to find more cost-effective producers. Thus, although the classical microbial synthesis has fairly high productivity, the source of carbon for the cultivation of microorganisms are sugars obtained from agricultural raw materials which could cause a threat for food industry. The new producer for production of polyhydroxyalkanoates (PHA) is cyanobacteria, the carbon source of which is carbon (IV) oxide or gas emissions from enterprises, which reduces the cost of the target product.

**Objective.** Development of a method for obtaining bioplastics using products of microbial synthesis and lignin.

**Methods.** Cyanobacteria *Nostoc commune* was grown using a nutrient medium BG-11 with subsequent limitation of Nitrogen for the synthesis of PHA. Hydrolyzed lignin from hardwoods was combined with polylactic acid (PLA) or cyanobacteria-synthesized PHA in different ratios with further casting of the solution to determine the ability of lignin and polymer matrix to form polymer films.

**Results.** The content of PHA in the cells of cyanobacteria *Nostoc commune*, when grown in a nutrient medium limited to Nitrogen, reached 7.8%. The synthesized polymer films based on PLA and lignin were not homogeneous, and films based on PHA and lignin were fragile.

**Conclusions.** The possibility of obtaining PHA by using cyanobacteria of the *Nostoc commune* species under environmental conditions that differ from the optimal ones for both cultivation and PHA production is shown. The possibility of obtaining a biopolymer based on lignin and PLA is shown. To form homogeneous films, it is necessary to change the standard conditions for obtaining a mixture of components. The interaction of lignin with PHA forms a homogeneous polymer mixture, which is fragile and requires the addition of plasticizers to obtain the necessary properties.

**Keywords:** lignin; cyanobacteria; polylactic acid; polyhydroxyalkanoates; bioplastic; industrial waste; renewable materials.

### Introduction

The world's demand for plastic products is growing every year. Natural gas and oil are used for their production, which leads to the depletion of their reserves and pollution of the environment during production. The main disadvantage of plastics is the long duration of their decomposition processes in the natural environment. Therefore, there is a need to create alternative products – bioplastics, the production of which would be associated with renewable raw materials and the possibility of their disposal in the wild [1]. Today, bioplastics make up only a small part of the global plastic products market, due to their high cost of \$ 2 to \$ 6

per kilogram, compared to the average price of traditional plastics, which cost \$ 1-2 per kilogram [2]. In addition, it should be noted that not all bioplastics are biodegradable or decompose rapidly under certain conditions, which in turn does not solve environmental problems.

The most common representative of bioplastics today is polylactic acid (PLA). It is similar in properties to polyethylene, terephthalate, and polystyrene [2, 3]. The monomer for the formation of polylactate is lactic acid, which is obtained by heterotrophic bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Sporolactobacillus* [4].

Another group of bioplastics that is of commercial interest – polyhydroxyalkanoates (PHA) –



biopolymers that have the ability to biodegrade and, moreover, the mechanical properties are not inferior to polypropylene. The most studied among PHA is polyhydroxybutyrate (PHB), which today is mainly synthesized on an industrial scale by heterotrophic bacteria such as *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* [5]. Unlike PLA, PHA polymers are synthesized in the middle of the cell and do not require an additional polymerization step [5].

Classical microbial synthesis has a fairly high productivity, but the source of carbon for the cultivation of microorganisms are sugars obtained from agricultural raw materials. The new producer for PHA production is cyanobacteria, the carbon source of which is carbon (IV) oxide or gas emissions from enterprises, which reduces the cost of the target product.

In order to increase the efficiency of PHA synthesis by cyanobacteria, various methods are used: limiting the nutrient medium by nitrogen, changing the temperature, pH. The influence of factors that affect metabolism depends on the type and strain of cyanobacteria. Thus, the most intense effect of nitrogen limitation was found in *Calothrix scytonemica* TISTR 8095 [6], *Chlorogloea fritschii* TISTR 8527 [7], *Synechocystis* sp. PCC 6714 [8], in which the content of PHB on dry cell mass increased almost 17, 13 and 9 times relative to cultivation under standard conditions. That is, to increase the yield of PHB, it is necessary to create conditions for the lack of nitrogen compounds in the environment.

It is known that the most cyanobacteria grow at the pH values from 7 to 9. This phenomenon is due to the fact that such conditions increase the efficiency of carbon uptake [9]. For *Nostoc muscorum* NCCU-442 [10] the highest PHB content was observed at pH 7.5 and was 7.6%, for *Scytonema geitleri* Bharadwaja [11] and *Synechocystis* sp. PCC 6803 [12] at pH 8.5 and was 3.98 and 4.55%, respectively, and for *Spirulina platensis* UMACC 159, 161, 162 [13] at pH 9.0, the PHB content was 7.1, 10.1, and 7.8%, respectively. Thus, for each species of microorganisms it is necessary to maintain the pH of the environment in which there is increased biosynthesis of PHB.

The temperature optimum for the cultivation of cyanobacteria is in the range from 20 to 35 °C. For PHB-producing microorganisms, the temperature optimum is  $29 \pm 1$  °C, which coincides with the temperature optimum for PHB synthesis. Thus, for *Scytonema geitleri* Bharadwaja [11] and *Nostoc muscorum* NCCU-442 [10] the highest PHB content was observed at 30 °C and amounted to 3.18 and 7.6%,

respectively, for *Synechocystis* sp. PCC 6803 [12] temperature optimum for PHB synthesis is slightly lower and is 28 °C with a PHB content of 4.55%.

The high cost of bioplastics production from the products of microorganism synthesis is a significant obstacle to their widespread distribution. Therefore, in order to reduce costs, it is proposed to use them in a mixture of natural biopolymers. One of such components may be lignin a by-product of hydrolysis of cellulose-containing raw materials, the cost of which is 0.27 USD per kilogram [14, 15]. The lignin market in 2019 was \$954.5 million. However, the processing of lignin into useful products is only 5% of the total amount of lignin [16, 17].

Therefore, the use of lignin as a component of bioplastics, will simultaneously reduce the cost of bioplastics and dispose of lignin as a waste product.

*The aim of the work* is development of a method for obtaining bioplastics using products of microbial synthesis and lignin.

## Materials and methods

Luminy brand PLA, a hydrolyzed lignin from hardwoods. The cyanobacterium *Nostoc commune* was used as a producer of PHA. To increase the biomass of cyanobacteria, BG-11 medium was used, followed by replacement of the medium with BG-0 (medium limited by nitrogen) in purpose to intensify the PHA synthesis process [18].

Cyanobacteria were grown in a 1 L photobioreactor with the use of 2:1 red and blue LEDs as a light source at 16:8 light cycle (light:dark).

The growth rate of cyanobacteria was observed by varying the density of the medium with the use of the bio ULAB 102 spectrophotometer and the number of cells on the Countess II cell counter.

To separate the PHA, cyanobacterial cells were filtered off and dried in an Labexpert 3050 oven (drying temperature 30 °C). Extraction was performed using chloroform at a temperature of 60 °C in the ratio of cell mass to mass of chloroform 1:1 for 36 h. The hot extract was filtered off on a vacuum filter followed by precipitation of the polymer in two volumes of diethyl ether. The resulting polymer was filtered off using filter paper (red ribbon) and washed with acetone and diethyl ether [19].

Before obtaining of bioplastics lignin, PHA, and PLA was dried to constant weight in an oven. Lignin was ground with a coffee grinder to a state of dust.

The selected polymer was dissolved in chloroform in a ratio of 1:10 for two hours, then created mixture was homogenized using stirring with a magnetic mixture for 15 min, then heated to 135 °C and add lignin in the amount of 1, 10, 20, 30, and 40% in a mixture with PLA (for PHA only 10%) of the amount of polymer. The resulting mixture was stirred for 10 minutes. After homogenization, the mixture was formed in Petri dishes and dried at room temperature for 24 hours.

To conduct statistical processing and data visualization Python's language modules Pandas, Seaborn, Matplotlib, and NumPy were used.

## Results

### Growing cyanobacteria

Typically the standard growth curve corresponds to the sigmoid shape curve that consists of four phases: lag, log, stationary and death phases (20). As can be seen from Fig. 1, which shows the change in density and number of cells in the process of growing cyanobacteria *Nostoc commune*, the growth of cyanobacteria corresponds to the standard growth curve of bacteria. The lag phase was quite long and amounted to 13 days, the period of exponential growth was 17 days, and steady state was observed during the last 8 days of the experiment. This long lag phase can be explained by a change in temperature ( $15 \pm 2$  °C), which differs from the optimal growing temperature ( $25 \pm 2$  °C) and lighting (did not use sunlight). This choice of LEDs is due to the absorption spectrum of chlorophyll and cyanobacteria. Due to the lack of yellow-green LEDs, the use of carotenoids for photosynthetic processes of cyanobacterial cells was absent. It is the rearrangement of the photosynthetic apparatus of cells that can explain the duration of the

lag phase. Nitrogen-depleted medium was used during the stationary growth phase. In this cultivation, the final PHA content was 7.8%.

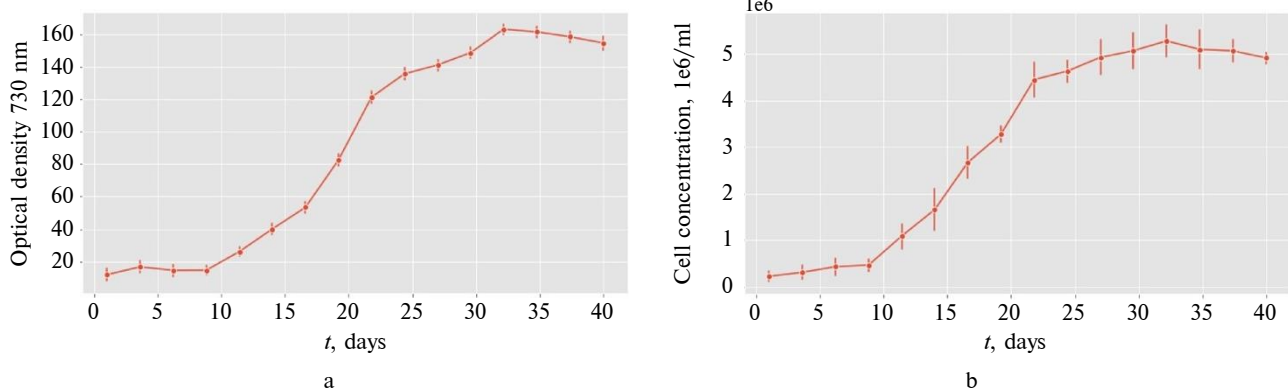
### The biopolymer synthesis

The biopolymer was prepared using a crushed mixture of natural polymers (lignin and PHA or PLA) according to the method [20]. The synthesized mixture of PLA and lignin is not homogeneous. Lignin particles are contained in the PLA in the form of inclusions ranging in size from 0.5 mm to 4 mm (Fig. 2). This can be explained by their large particle size to obtain a biopolymer or the adhesion of smaller particles during the synthesis process. This is typical for a mixture with a lignin content of 10 to 40%. The formed polymer films are quite elastic and do not break during assembly, however dents remain at the assembly site, but when the formed film is heated with warm air, the dents are smoothed.

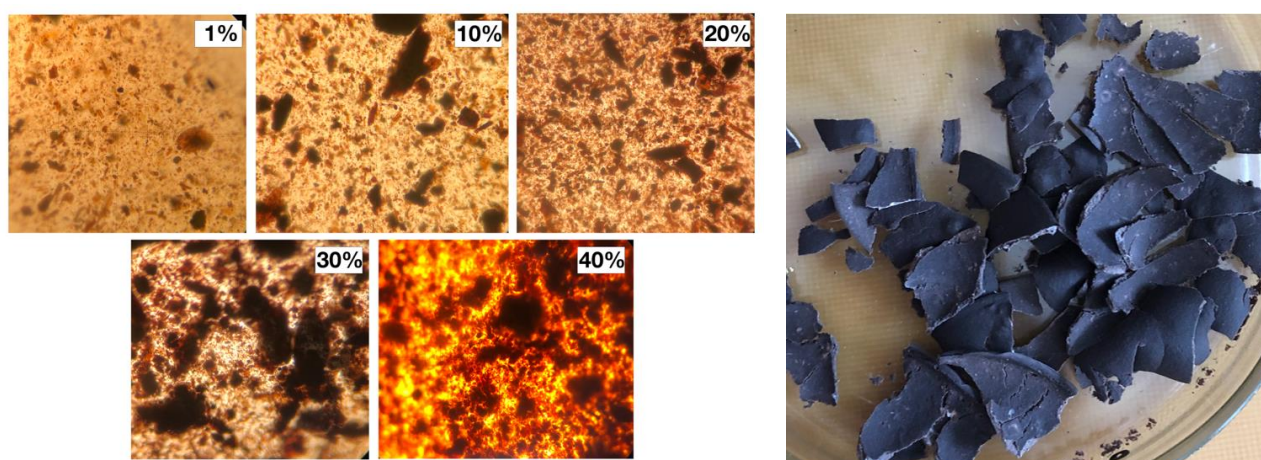
During storage of the formed film for 30 days, the appearance of brittleness of the material was observed, which may indicate the beginning of the process of destruction of the polymer due to the low level of homogeneity of the polymer mixture.

In contrast to the bioplastic of lignin from PLA in the synthesis of bioplastic from 10% lignin and PHA, the resulting mixture had a homogeneous composition. However, after drying, a uniform film was not formed, there were bulges on the surface. The polymer was brittle and under the action of applied force disintegrated into pieces (Fig. 3).

Thus, to obtain biopolymers based on lignin and PLA, it is necessary to change the conditions of polymer synthesis to achieve its homogeneity. In the case of using lignin and PHA to achieve plasticity, it is necessary to use plasticizers that will achieve plasticity in the formed polymer.



**Figure 1:** Change in optical density (a) and number of cyanobacteria *Nostoc commune* cells (b) (cell concentration –  $10^6$  cells per ml) with time of the cyanobacteria *Nostoc commune* growth



**Figure 2:** PLA-lignin bioplastic with lignin content of 1, 10, 20, 30, 40% ( $\times 15$ ) **Figure 3:** Bioplastic based on PHA and 10% lignin

## Discussion

The results obtained in this paper are slightly different from those shown by other studies. For example (21), bioplastics based on PHB and lignin (with a lignin content of 40%) had a fairly high homogeneity, while improving the mechanical properties. This can be explained by the low lignin content, which led to delamination between the components of the composite, as well as the inadequate quality of the obtained PHA. In order to solve the existing problem, it is necessary to study the synthesized PHA, in order to establish qualitative characteristics, as well as to change the composition of the composite, either by increasing the amount of lignin or by adding compatibilizers that will increase system homogeneity.

Bioplastics based on lignin and PLA, obtained by solution casting, confirmed the data of works in which other methods of obtaining a polymer mixture were used [22, 23]. This may indicate that the method of creating a polymer mixture has little effect on the final product, and in order to increase the homogeneity of the mixture, the addition of compatibilizers is a necessary step.

## References

- [1] Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv.* 2017;3(7):e1700782. DOI: 10.1126/sciadv.1700782
- [2] Bioplastics & Biopolymers Market Global Forecast to 2026 | MarketsandMarkets [Internet]. Marketsandmarkets.com. 2022 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopolymers-bioplastics-market-88795240.html>
- [3] What is PLA? (Everything You Need To Know) [Internet]. Twi-global.com. 2022 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/what-is-pla>

## Conclusions

The possibility of obtaining PHA by using cyanobacteria of the *Nostoc commune* species under environmental conditions that differ from the optimal ones for both culture and PHA production is shown.

The possibility of obtaining a biopolymer based on lignin and PLA is shown. To form homogeneous films, it is necessary to change the standard conditions for obtaining a mixture of components.

The interaction of lignin with PHA forms a homogeneous polymer mixture, which is fragile and requires the addition of plasticizers to obtain the necessary properties.

In order to improve the combination of lignin and selected polymer matrices, the addition of compatibilizers or the use of other bioplastic synthesis techniques will be considered in further studies.

## Interest disclosure

Nataliia Golub is the member of the Editorial Council of *Innovative Biosystems and Bioengineering* and was not involved in the editorial evaluation or decision to accept this article for publication. The other authors have no conflicts of interest to declare.

- [4] Lopes MS, Jardini AL, Filho RM. Synthesis and characterizations of poly (lactic acid) by ring-opening polymerization for biomedical applications. *Chem Eng Trans*. 2014;38:331-6. DOI: 10.3303/CET1438056
- [5] Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev*. 2009;38(8):2434-46. DOI: 10.1039/b812677c
- [6] Kaewbai-ngam A, Incharoensakdi A, Monshupanee T. Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemica* TISTR 8095. *Bioresour Technol*. 2016;212:342-7. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.035
- [7] Monshupanee T, Nimdach P, Incharoensakdi A. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in auto-sedimenting cyanobacterium. *Sci Rep*. 2016 Nov 15;6(1):37121. DOI: 10.1038/srep37121
- [8] Kamravamanesh D, Pflügl S, Nischkauer W, Limbeck A, Lackner M, Herwig C. Photosynthetic poly-β-hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714. *AMB Express*. 2017 Dec;7(1):143. DOI: 10.1186/s13568-017-0443-9
- [9] Price S, Kuzhiumparambil U, Pernice M, Ralph PJ. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate for sustainable bioplastic production: Critical review and perspectives. *J Environ Chem Eng*. 2020;8(4):104007. DOI: 10.1016/j.jece.2020.104007
- [10] Ansari S, Fatma T. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS One*. 2016 Jun 30;11(6):e0158168. doi: 10.1371/journal.pone.0158168
- [11] Singh MK, Rai PK, Rai A, Singh S. Poly-β-Hydroxybutyrate production by the cyanobacterium *Scytonema geitleri* Bharadwaja under varying environmental conditions. *Biomolecules*. 2019 May 21;9(5):198. DOI: 10.3390/biom9050198
- [12] Panda B, Jain P, Sharma L, Mallick N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresour Technol*. 2006 Jul;97(11):1296-301. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.05.013
- [13] Jau MH, Yew SP, Toh PSY, Chong ASC, Chu WL, Phang SM, et al. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. *Int J Biol Macromol*. 2005 Aug;36(3):144-51. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2005.05.002
- [14] Accelerators Lignin, Grade Standard: Industrial Grade, Rs 40 /kilogram [Internet]. *indiamart.com*. 2022 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <https://www.indiamart.com/proddetail/lignin-21090426788.html>
- [15] Glasser WG. About making lignin great again—some lessons from the past. *Front Chem*. 2019 Aug 29;7:565. DOI: 10.3389/fchem.2019.00565
- [16] Lignin Market Size Growth | Global Industry Analysis Report, 2018-2025 [Internet]. *Grandviewresearch.com*. 2022 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lignin-market>
- [17] Li C, Zhao X, Wang A, Huber GW, Zhang T. Catalytic transformation of lignin for the production of chemicals and fuels. *Chem Rev*. 2015 Nov 11;115(21):11559-624. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00155
- [18] Behle A. Recipe for standard BG-11 media [Internet]. *Protocols.io*. 2022 [cited 2021 Dec 31]. Available from: <https://www.protocols.io/view/recipe-for-standard-bg-11-media-7kmhku6>
- [19] Yellore V, Desai A. Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24. *Lett Appl Microbiol*. 1998 Jun;26(6):391-4. DOI: 10.1046/j.1472-765x.1998.00362.x
- [20] Moghanjoghi SM, Ganjibakhsh M, Gohari NS, Izadpanah M, Rahmati H, Gorji ZE, et al. Establishment and characterization of rough-tailed gecko original tail cells. *Cytotechnology*. 2018;70(5):1337-47. DOI: 10.1007/s10616-018-0223-7
- [21] Mousavioun P, Halley PJ, Doherty WOS. Thermophysical properties and rheology of PHB/lignin blends. *Ind Crops Prod*. 2013;50:270-5. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.07.026
- [22] Anwer MAS, Naguib HE, Celzard A, Fierro V. Comparison of the thermal, dynamic mechanical and morphological properties of PLA-Lignin & PLA-Tannin particulate green composites. *Compos Part B Eng*. 2015;82:92-9. DOI: 10.1016/j.compositesb.2015.08.028
- [23] Wang S, Li Y, Xiang H, Zhou Z, Chang T, Zhu M. Low cost carbon fibers from bio-renewable Lignin/Poly(lactic acid) (PLA) blends. *Compos Sci Technol*. 2015;119:20-5. DOI: 10.1016/j.compscitech.2015.09.021

А.В. Юрченко<sup>1</sup>, Н.Б. Голуб<sup>1</sup>, Л. Цзінпін<sup>2</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

<sup>2</sup>Технологічний університет Цзілу (Шаньдунська академія наук), Шаньдун, Китай

#### РОЗРОБКА НОВОГО СПОСОБУ ОТРИМАННЯ БІОПЛАСТИКІВ НА ОСНОВІ МІКРОБНИХ БІОПОЛІМЕРІВ І ЛІГНІНУ

**Проблематика.** Постійне зростання попиту на пластичні полімерні вироби з одночасним виснаженням запасів викопних джерел, таких як нафта і природний газ, а також посилення проблеми утилізації відходів створюють потребу в пошуку альтернативних технологій, що відповідали б сучасним тенденціям як екологічного, так і економічного курсу світового розвитку. Як така альтернатива розглядаються біопластичні матеріали, що синтезуються з поновлюваних джерел і мають здатність до

біорозкладу. Основна перепона сучасних біопластиків, які унеможливають повну заміну традиційних пластмас, – висока вартість виробництва. З метою зниження собівартості існуючих біополімерів до складу полімерної матриці додають відходи виробництва. Одним із таких відходів є лігнін – другий найпоширеніший біополімер. Додатковим шляхом зниження собівартості виробництва є пошук більш економічно вигідних продуцентів. Так, класичний мікробний синтез хоч і має досить високу продуктивність, але джерелом карбону для вирощування мікроорганізмів є цукри, які отримують із сільськогосподарської сировини. Новим продуцентом для одержання полігідроксиалканоату (ПГА) є ціанобактерії, джерелом карбону для яких є карбон (IV) оксид або газові викиди підприємств, що знижує собівартість цільового продукту.

**Мета.** Розробка методу отримання біопластику за використання продуктів мікробного синтезу та лігніну.

**Методика реалізації.** Ціанобактерії *Nostoc commune* вирощували при використанні живильного середовища BG-11 із подальшим лімітуванням за нітрогеном з метою синтезу ПГА. Гідролізний лігнін із твердих порід дерев поєднували з полілактидом (ПЛА) або синтезованим ціанобактеріями ПГА в різних співвідношеннях методом лиття розчину з метою виявлення здатності лігніну та полімерної матриці утворювати полімерні плівки.

**Результати.** Вміст ПГА у клітинах ціанобактерії *Nostoc commune* при вирощуванні у живильному середовищі, лімітованому за нітрогеном, досяг 7,8 %. Синтезовані полімерні плівки на основі ПЛА та лігніну не були гомогенними, а на основі ПГА є крихкими.

**Висновки.** Показано можливість отримати ПГА за використання ціанобактерій виду *Nostoc commune* за умов навколишнього середовища, що відрізняються від оптимальних як для вирощування культури, так і для отримання ПГА. Показано можливість отримати біополімер на основі лігніну та ПЛА. Для утворення гомогенних плівок необхідно змінити стандартні умови отримання суміші компонентів. При взаємодії лігніну з ПГА утворюється гомогенна полімерна суміш, яка є крихкою і потребує для набуття необхідних властивостей додавання пластифікаторів.

**Ключові слова:** лігнін; ціанобактерії; полілактид; полігідроксиалканоат; біопластик; промислові відходи; відновлювані матеріали.

## ВМІСТ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ У РОСЛИНАХ ПШЕНИЦІ ПОЛБИ ЯК КРИТЕРІЙ ПРОДУКТИВНОСТІ ЗА ТРАДИЦІЙНОЇ ТА ОРГАНІЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЙ ВИРОЩУВАННЯ

I.В. Короткова<sup>1</sup>, Т.О. Чайка<sup>2\*</sup>, Т.П. Ромашко<sup>1</sup>, А.М. Рибальченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Полтавський державний аграрний університет, Полтава, Україна

<sup>2</sup>Полтавське відділення академії наук технологічної кібернетики України, Полтава, Україна

\*Corresponding author: chayka\_ta@ukr.net

Received 20 April 2022; Accepted 19 May 2022

**Проблематика.** Визначення вмісту хлорофілу та каротиноїдів є інформативним способом отримання уявлень про фотосинтетичний режим рослин і є непрямим методом оцінки продуктивності рослинних культур, у т.ч. зернових. Оскільки на сьогодні зростає світовий попит на традиційні та натуральні продукти харчування, у представленій роботі ми використовували одну з найдавніших злакових культур – пшеницю полбу (*Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl), вирощування якої здійснювали за традиційною й органічною технологіями.

**Мета.** Визначення впливу хлорофілу та каротиноїдів на продуктивність пшениці полби за традиційної та органічної технології землеробства та різних систем передпосівної обробки насіння.

**Методика реалізації.** Польові дослідження проводили впродовж 2019–2021 рр. на чорноземах малогумусних важкосуглинистих, стан яких відповідає критерію “цілинна земля”. Вирощування полби звичайної за органічної технології проводили у сівозміні: жито озиме (сидеральна культура) – гірчиця (для поліпшення фітосанітарного стану поля та показників органічної речовини ґрунту) – полба звичайна. Вивчено два варіанти передпосівної обробки насіння: опромінення ультрафіолетовим світлом діапазону С (УФ-С) (100–280 нм) та обробка насіння препаратом гумінової природи 1g Seed Treatment. У традиційній технології вирощування пшениці полби передпосівну підготовку насіння здійснювали УФ-С-опроміненням. В органічній технології використовували як УФ-С-опромінення, так і окремо обробку насіння розчином 1g Seed Treatment. Статистичну обробку даних проводили методами описової статистики, регресійного та дисперсійного аналізу з використанням програми Statistica 10.0. Значимість експериментальних даних оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) для розрахунку найменшої істотної різниці НІР<sub>05</sub>.

**Результати.** Встановлено, що використання УФ-С-опромінення насіння в органічній та традиційній технологіях культивування сприяє збільшенню вмісту хлорофілу *a* (*Chl a*) на 9,2 % і хлорофілу *b* (*Chl b*) на 14,5 % у рослинах, вирощених за органічної технології, однак зменшує вміст каротиноїдів (*Ct*) на 14,9 %. Збільшення вмісту фотосинтетичних пігментів за УФ-С-опромінення насіння привело до зростання врожайності від 4,26 т/га за традиційної технології до 5,17 т/га за органічної, тобто на 21,4 %. За органічної технології вирощування на основі порівняння основних показників роботи фотосинтетичного апарату рослин пшениці полби й обсягу врожайності визначено найбільш ефективний спосіб підготовки насіння до сівби. Виявлено, що за використання гумінового препарату 1g Seed Treatment у передпосівній обробці насіння концентрація *Chl a* зменшилась на 2,4 %, концентрація *Chl b* та *Ct* збільшилась на 5 та 25,5 % відповідно порівняно з показниками рослин, вирощених з УФ-С опроміненого насіння. Урожайність за використання препарату 1g Seed Treatment становила 5,58 т/га, тоді як за УФ-С-обробки насіння – 5,17 т/га, тобто приріст урожайності становив 8 %. Встановлено обернену кореляцію між співвідношенням вмісту фотосинтетичних пігментів *Chl a/Chl b* та обсягом урожайності пшениці полби.

**Висновки.** Завдяки впровадженню органічної технології вирощування з передпосівною обробкою насіння гуміновим препаратом 1g Seed Treatment можна отримати збільшення врожайності пшениці полби на рівні 31 % порівняно з традиційною технологією. Індикаторами ефективності запропонованих елементів агротехнологій може бути вміст фотосинтетичних пігментів та їх співвідношення.

**Ключові слова:** фотосинтетичні пігменти; органічне землеробство; передпосівний обробіток; сівозміна; УФ-С-опромінення; пшениця *Triticum dicoccum*.

### Вступ

В аграрному виробництві України та більшості країн світу зернові є найважливішою групою рослинних культур з економічної й

агрономічної точки зору. Злаки широко використовуються для виробництва хліба – основного продукту харчування людини – і є цінним джерелом біологічно активних речовин. Схильність споживачів до більш натуральної їжі в

останні роки змусила аграріїв звернутися до сталого сільського господарства та відродити найдавніші злакові культури, до яких належать півкові пшениці (однозернянка, полба, спельта тощо).

Полба є однією з перших одомашнених зернових культур, культивованою протягом 5000 років існування сільського господарства світу. Однак упродовж століть полба поступово відходила на другий план через конкуренцію більш продуктивних гібридних сортів твердої пшениці; лише на початку 2000-х у всьому світі почався процес відновлення культивування полби, яку часто називають “емер”. Слід зазначити, що в наукових публікаціях щодо позначення цієї культури є розбіжності та дуже часто використовують термін “спельта” як для *Triticum Spelta L.*, так і для *Triticum Dicoccum Schrank.* Однак, як доводиться в роботі [1], лише до *Triticum dicoccum (Schrank.) Schuebl* слід застосувати термін “полба”, тобто “емер”. На теперішній час пшениця емер (*Triticum dicoccum (Schrank) Schübler*) культивується органічними фермерами в багатьох країнах Центральної Європи [2], оскільки є функціональним харчовим інгредієнтом. Наразі в Україні зареєстровані та культивуються три сорти пшениці полби звичайної – Голіковська, Романівська, Юніка.

Зацікавленість у пшениці полби зумовлена поширенням попиту на традиційні та натуральні продукти харчування. Хоча пшениця звичайна (*Triticum aestivum*) є основним видом, що вирощується у світі, останніми роками зацікавленість у пшениці полби зростає завдяки її високій поживній цінності, нижчій засвоєваності крохмалю порівняно з іншими сучасними видами пшениці, підвищеному вмісту антиоксидантних сполук і низькому вмісту глютену. Різні дослідження хімічного складу показали, що пшениця емер має високий рівень білка (13,5–19,05 %), крохмалю (55,4–73,3 %), харчових волокон (10–12 %), ліпідів (2,4–3,0 %) і загальних токоферолів (19,7–69,85 мг/г) [2]. Достатньо високим виявився вміст селену в зернах емера (58,9–68,4 мкг/кг), загальних поліфенолів (584–692 мг/кг) [3], основних макроелементів Р (5,12 г/кг) та К (4,39 г/кг) та мікроелементів Zn (54 мг/кг), Fe (49 мг/кг) і Mn (24 мг/кг) [4].

У зв'язку з цим останні 20 років попит на зерно цієї культури швидко збільшується і, за прогнозами, буде продовжувати зростати приблизно на 5 % щорічно. На жаль, на сьогодні частка полби у світовому виробництві пшениці становить лише близько 1 % [5]. Однак збіль-

шення попиту на цей вид пшениці вимагає удосконалення технологій її вирощування для отримання якісного зерна, виходячи з технологічних властивостей культури, ґрунтово-кліматичних умов та елементів агротехнологій. Саме тому при вирощуванні пшениці полби все частіше звертаються до органічного землеробства, яке здатне забезпечити екологічно безпечну та біологічно повноцінну продукцію. Гарантією одержання такої продукції є повна відмова від застосування мінеральних добрив, пестицидів та інших штучних хімічних сполук.

Органічне сільське господарство передбачає використання біологічних факторів підвищення природної родючості ґрунтів, агроекологічних методів і біологічних засобів боротьби зі шкідниками та хворобами, створює умови для збереження біорізноманіття [6]. В органічному сільському господарстві позитивний баланс гумусу формується насамперед за рахунок повного повернення в ґрунт побічних продуктів і максимального насичення сівозмін проміжними сидератами. Важливим елементом екологічної складової виробництва є використання мікробних препаратів, зокрема з добривами, які, активуючи й оптимізуючи поживні речовини виробничого процесу, збільшують біомасу. Сукупність указаних факторів дає змогу досягти позитивних балансів гумусу та прийнятних балансів основних елементів живлення з компенсацією незначних дефіцитів, насамперед фосфору, за рахунок поновлюваних запасів ґрунту без порушення екологічного балансу агроєкосистем. У сівозмінах органічного сільського господарства, побудованих за такими умовами, з часом досягається стан стійкої екологічної рівноваги агроценозів [7].

Однак, незважаючи на достатню кількість переваг органічного сільського господарства над традиційним [8], сучасні виробники сільськогосподарської продукції не поспішають до його впровадження в практику через низку чинників, у т.ч. фінансових (відсутність прибутку перші 2-3 роки, витрати на сертифікацію та інспекцію тощо), хоча вже є певний досвід впровадження такої системи при вирощуванні зернових [6].

На сьогодні в Україні площі під ведення органічного виробництва становлять 0,7 % земель сільськогосподарського призначення. Слід зазначити, що понад 90 % виробленої вітчизняної органічної продукції експортується. Продаж продукції всередині країни забезпечує виробникам рентабельність близько 70 %, тоді як

реалізація до країн-членів ЄС – близько 200 %. Із введенням цін на “органічну” продукцію, які кожен виробник формує, виходячи з власних витрат, більшість культур досягають прийняттого рівня рентабельності, за винятком ярої пшениці, жита, ячменю та гороху, і тому для досягнення стійкого рівня конкурентоспроможності органічного виробництва необхідно забезпечити відповідний ціновий механізм для його функціонування, як це практикується в інших країнах [10].

Метою нашого дослідження є визначення ролі хлорофілу та каротиноїдів у формуванні продуктивності пшениці полби (*Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl) за традиційної та органічної технології землеробства за різних систем передпосівної обробки насіння: опромінення ультрафіолетовим світлом діапазону С (100–280 нм) та обробка насіння препаратом гумінової природи 1r Seed Treatment.

### Матеріали і методи

Польові дослідження проводили впродовж 2019–2021 рр. на чорноземах малогумусних важкосуглинистих, стан яких відповідає критерію “цілинна земля”. Вміст гумусу становив 4,9–5,2 %, рН 6,3,  $P_2O_5$  – 100–150 мг/кг,  $K_2O$  – 160–200 мг/кг, азоту – 54,4–81,0 мг/кг ґрунту. Загальна площа дослідної ділянки становила 25 га, облікова – 1 га, повторність досліду триразова, розміщення варіантів рендомізоване.

Для дослідження було вибрано полбу звичайну сорту Голіковська, оригіномом якого є Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр’єва Національної академії аграрних наук України.

Передпосівну обробку насіння для вирощування за традиційної технології здійснювали ультрафіолетовим (УФ) опромінюванням лампою типу ZW20D15W потужністю 20 Вт дозою 150 Дж/м<sup>2</sup> згідно з методикою, описаною в роботі [11]. Указана доза була встановлена експериментально через опромінення 6 сортів пшениці озимої (*Triticum aestivum* L.) УФ-С-променями діапазону 50–1000 Дж/м<sup>2</sup>. Результатом опромінення було підвищення енергії проростання насіння на 30–37 %, схожості – на 21–38 %, довжини коренів – у 2,0–3,6 разу, висоти паростків – у 2,0–3,4 разу порівняно з контрольними зразками. В органічній технології використовували два варіанти передпосівної обробки насіння: 1 – УФ-С-опромінення дозою

150 Дж/м<sup>2</sup> (аналогічно традиційній); 2 – обробку насіння пшениці полби природним гуміновим препаратом 1r Seed Treatment у нормі 2,0 л/т насіння. Цей препарат виробляється компанією SoilBiotics (США) на основі гумінових, фульвових та ульмінових кислот, отриманих із леонардиту, і призначений для передпосівної обробки насіння. 1R Seed treatment містить у своєму складі 20 % діючої речовини: 10 % – гумінові кислоти, 3 % – фульвові кислоти, 1 % – ульмінові кислоти та приблизно 6 % комплексу макро- та мікроелементів, %: N – 0,21, P – 0,01,  $P_2O_5$  – 0,02, K – 2,290,  $K_2O$  – 2,759, S – 0,170, Mg – 0,040, Ca – 0,340, Na – 0,070.

У нашій роботі ми вивчали два агрохімічних фони: 1 – карбамідно-аміачну суміш (КАС) (традиційна технологія); 2 – без використання добрив (органічна технологія). Внесення КАС здійснювали на початку вегетації в дозі 40 кг діючої речовини на гектар [12].

Вирощування полби звичайної за органічної технології проводили у сівозміні: жито озиме – гірчиця – полба звичайна. Урожайність гірчиці та полби звичайної як органічних продуктів визначали у фазі повної стиглості з перерахунком на стандартну вологість зерна 14,0 %.

Матеріал для визначення фотосинтетичних пігментів відбирали у фазу “початок цвітіння” та обробляли в свіжому стані відразу після збору. Екстрагували пігменти 96 %-вим етанолом протягом 2-х діб. Вміст хлорофілу *a*, хлорофілу *b* і загальний вміст каротиноїдів у прапорцевому листку пшениці полби визначали на початку цвітіння рослини за методикою [13]. Спектрофотометричне вимірювання оптичної густини екстрактів проводили за максимумами поглинання хлорофілу *a* – 665 нм, хлорофілу *b* – 649 нм, каротиноїдів – 470 нм на фотометрі КФК-3-01 (315–990 нм). Розрахунок вмісту пігментів у етанольних екстрактах виконували за формулами [13]:

$$C_{\text{хл } a} = [(13,95D_{665} - 6,88D_{649}) \cdot V] / m,$$

$$C_{\text{хл } b} = [(24,96D_{649} - 7,32D_{665}) \cdot V] / m,$$

$$C_{\text{кар}} = [1000D_{470} \cdot V / m - 2,05C_{\text{хл } a} - 114,8C_{\text{хл } b}] / 245,$$

де  $C_{\text{хл } a}$ ,  $C_{\text{хл } b}$ ,  $C_{\text{кар}}$  – кількість хлорофілів *a*, *b* і каротиноїдів, мг/г сирової речовини;  $D_{665}$ ,  $D_{649}$  і  $D_{470}$  – оптична щільність спиртового екстракту пігментів за довжин хвиль (нм): 665, 649 та 470 відповідно;  $m$  – маса наважки, мг;  $V$  – об’єм етанолу, см<sup>3</sup>.



Статистичну обробку даних проводили методами описової статистики, регресійного та дисперсійного аналізу з використанням програми Statistica 10.0. Значимість експериментальних даних оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA) для розрахунку найменшої істотної різниці НІР<sub>05</sub>.

### Результати

У представленій роботі нами було досліджено вплив різних варіантів передпосівної підготовки насіння пшениці полби на вміст головних елементів фотосинтетичного апарату – хлорофілів *a* і *b* та каротиноїдів – за різних технологій вирощування культури та встановлено їхній зв'язок з урожайністю. Результати проведених досліджень представлені в таблиці.

Як видно з таблиці, на вмісті зелених пігментів у листі пшениці суттєво позначилась органічна технологія вирощування культури, внаслідок чого спостерігали збільшення на 11 % загального вмісту хлорофілів *Chl(a+b)* порівняно з традиційною технологією.

Однак рівень фотосинтетичних пігментів у листі пшениці достовірно різнився не лише за технологіями вирощування, а й за способами передпосівної обробки насіння. Так, порівняння концентрації хлорофілів *Chl a* і *Chl b* та каротиноїдів за традиційної та органічної технологій вирощування, але однакового способу обробки насіння (УФ-С-опромінення) показало збільшення концентрації *Chl a* на 9,2 %, *Chl b* на 14,5 % за органічної технології, водночас рівень *Ct* зменшився на 14,9 %. Урожайність за традиційної технології становила 4,26 т/га, а за органічної – 5,17 т/га, тобто зі збільшенням концентрації *Chl a* та *Chl b* і зменшенням концентрації *Ct* урожайність зросла на 21,4 %.

Статистичний аналіз результатів досліджень підтвердив зв'язок між рівнем урожайності та вмістом *Chl a* і *Chl b* з відповідними коефіці-

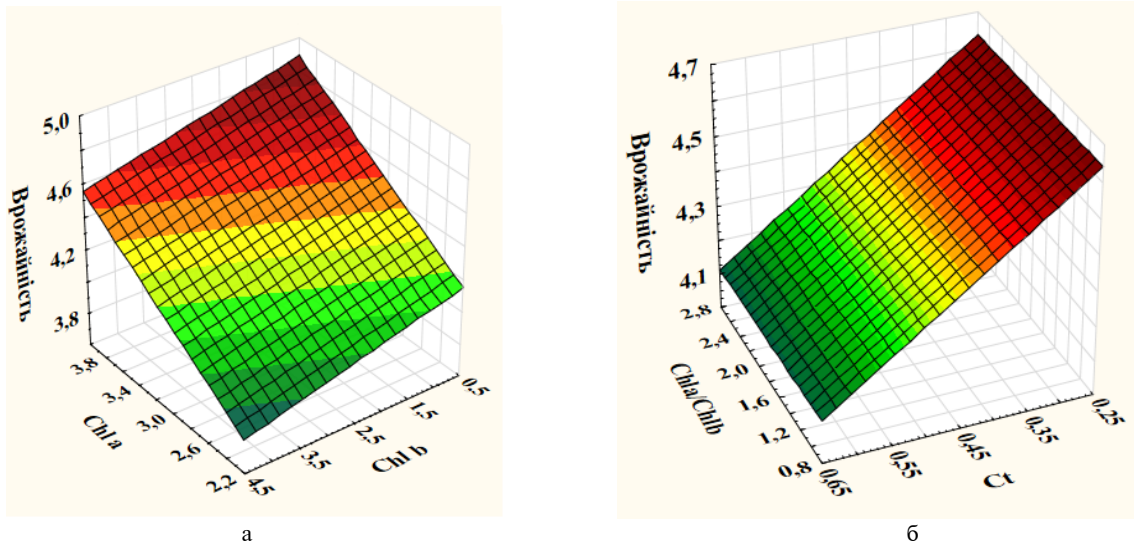
ентами кореляції. Нами встановлено пряму кореляційну залежність із середнім зв'язком між концентрацією *Chl a* та врожайністю за традиційної ( $r = 0,603$ ) й органічної технологій ( $r = 0,533$ ). Однак між концентрацією *Chl b* та врожайністю спостерігали пряму кореляційну залежність із сильним зв'язком за органічної технології ( $r = 0,9996$ ) та слабким – за традиційної ( $r = 0,317$ ). Між концентрацією каротиноїдів та рівнем врожайності спостерігали середній і сильний зворотній зв'язок за органічної та традиційної технологій із коефіцієнтами кореляції  $r = -0,577$  і  $r = -0,9989$  відповідно (рис. 1, 2).

Застосування різних способів передпосівної обробки насіння за органічної технології вирощування також позначилось на вмісті обох форм хлорофілів і каротиноїдів. Використання гумінового препарату 1r Seed Treatment у підготовці насіння до сівби зумовило певні зміни у пігментному складі рослин пшениці – концентрація *Chl a* неістотно зменшилась (2,4 %), концентрація *Chl b* збільшилась на 5 %. Однак істотніше збільшився вміст каротиноїдів – на 25,5 % порівняно з показниками рослин пшениці, вирощеної з УФ-С-опроміненого насіння. Урожайність за УФ-С-обробки насіння становила 5,17 т/га, а за використання препарату 1r Seed Treatment – 5,58 т/га, тобто приріст урожайності становив приблизно 8 % (див. таблицю). Коефіцієнти кореляції між концентрацією хлорофілів *Chl a* і *Chl b* та урожайністю за органічної технології та передпосівної обробки насіння препаратом 1r Seed Treatment дорівнювали  $r = 0,994$  та  $r = 0,998$  відповідно, що свідчить про наявність сильної прямої залежності між цими показниками (рис. 3). Однак за цієї технології вирощування між вмістом каротиноїдів та урожайністю встановлено обернену середню залежність із коефіцієнтом кореляції  $r = -0,593$ .

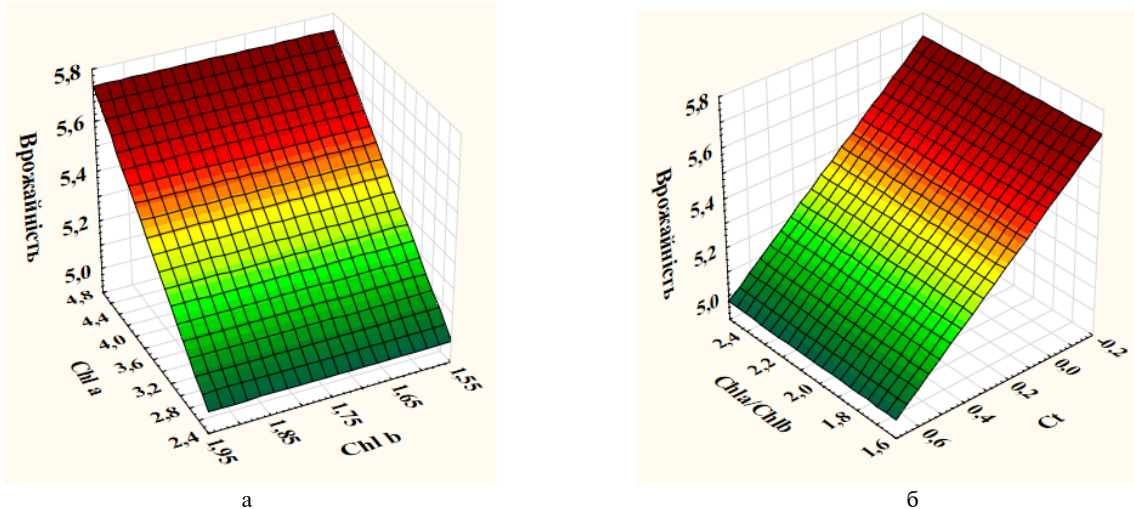
**Таблиця:** Вміст фотосинтетичних пігментів у рослинах пшениці полби за різних технологій вирощування культури\*

Технологія	Вміст фотосинтетичних пігментів, мг/г						Урожайність, т/га
	<i>Chl a</i>	<i>Chl b</i>	<i>Ct</i>	<i>Chl(a+b)</i>	<i>Chl a/Chl b</i>	$(Chl a + Chl b): Ct$	
Традиційна (УФ-С)	2,73	1,45	0,54	4,18	1,88	7,74	4,26
Органічна (УФ-С)	2,98	1,66	0,47	4,64	1,79	9,87	5,17
Органічна (1r Seed Treatment)	2,91	1,74	0,59	4,65	1,67	7,88	5,58
НІР <sub>05</sub>	0,05	0,04	0,02	0,12	0,11	0,08	0,28

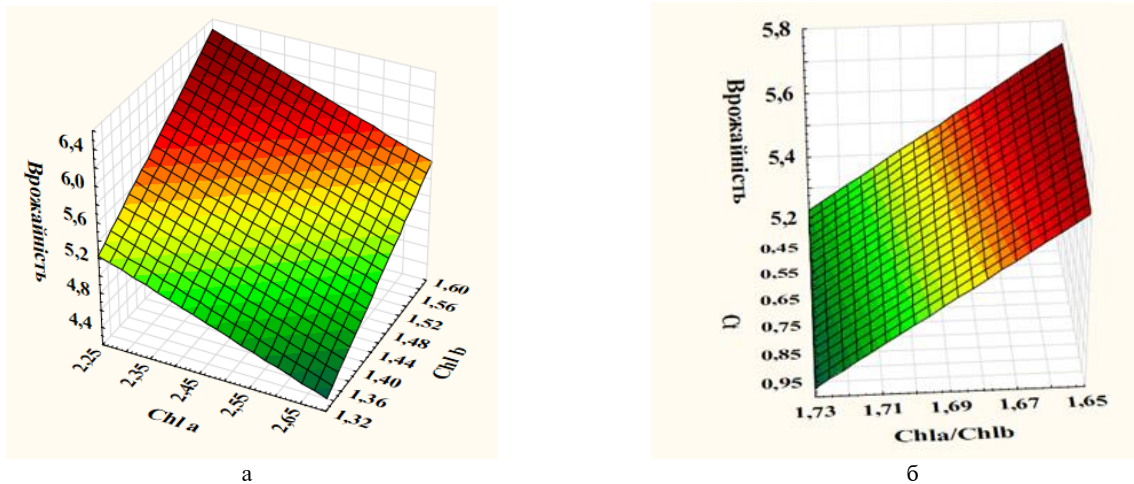
\*За органічної технології вирощування передпосівну обробку насіння проводили опромінюванням УФ-С-променями/обробкою препаратом 1r Seed Treatment.



**Рисунок 1:** Графіки лінійної регресії врожайності пшениці полби за традиційної технології вирощування від: (а) вмісту *Chl a* і *Chl b*; (б) співвідношення *Chl a/Chl b* і вмісту каротиноїдів *Ct*



**Рисунок 2:** Графіки лінійної регресії врожайності пшениці полби за органічної технології вирощування (УФ-С-обробка насіння) від: (а) вмісту *Chl a* і *Chl b*; (б) співвідношення *Chl a/Chl b* і вмісту каротиноїдів *Ct*



**Рисунок 3:** Графіки лінійної регресії врожайності пшениці полби за органічної технології вирощування (обробка насіння Ir Seed Treatment) від: (а) вмісту *Chl a* і *Chl b*; (б) співвідношення *Chl a/Chl b* і вмісту каротиноїдів *Ct*

Позитивний вплив стимуляторів росту природного походження (бішофіту, гумінових препаратів тощо) на фотосинтетичний потенціал зернових культур раніше був описаний нами в роботах [14, 15]. Показано, що передпосівна обробка насіння 1%-ним розчином бішофіту сприяє посиленню фотосинтетичної активності посівів ячменю, що відображається у збільшенні площі асиміляційної листової поверхні рослин на 11,1%, величини фотосинтетичного потенціалу на 5,7% та продуктивності фотосинтезу посівів на 10% порівняно з контролем. Автори роботи [16] встановили, що використання гумінового препарату 1R Seed treatment у передпосівній підготовці насіння пшениці дає змогу підвищити врожайність зерна на 0,43 т/га, що становить майже 12%.

### Обговорення

У нашому попередньому дослідженні на прикладі пшениці полби (*Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl) [10] було доведено переваги органічної технології вирощування культури над традиційною та виконано економічне обґрунтування. Встановлено, що отриманий приріст врожайності за органічною технологією зумовлений накопиченням основних елементів живлення рослин у ґрунті, які залишаються після вирощування жита озимого як сидерату та гірчиці й залучаються до ґрунтовопоглинаючого комплексу.

Однак це не єдиний показник агротехнології, здатний впливати на формування продуктивності в умовах органічного способу вирощування культури. Наявність великої кількості компонентів агротехнологій, складна система їх регуляції, вплив факторів зовнішнього середовища суттєво ускладнюють виявлення ознак, пов'язаних із формуванням високої продуктивності рослин пшениці полби як у традиційній, так і в органічній технології вирощування. Незважаючи на те що зростання рослин контролюється багатьма фізіологічними, біохімічними та молекулярними процесами, ключовим є все ж фотосинтез. Саме поживні речовини, що утворюються і накопичуються у ґрунті, відіграють фундаментальну роль у структурних та функціональних компонентах фотосинтетичного апарату, а оптимальне забезпечення поживними речовинами є важливим для біосинтезу фотосинтетичних пігментів рослин [17].

На сьогодні єдиної думки щодо оптимальної кількості хлорофілу в листі та його впливу

на продуктивність культури пшениці не існує. Одні дослідники вважають, що рівень хлорофілу має бути невисоким. Вони пов'язують це з тим, що зменшення кількості поглиненого світла запобігає руйнуванню фотосинтетичного апарату надлишком поглиненої енергії, тому невисокий вміст хлорофілу в листі може забезпечувати його більш ефективну роботу [18, 19]. Однак автори дослідження [20] встановили, що за умов дефіциту хлорофілу фотосинтетична активність гальмується. Інші, навпаки, вважають, що рослини з підвищеним рівнем хлорофілу поглинають більше енергії, внаслідок цього фотосинтез у них ефективніший [21], що обумовлює високу продуктивність культури [22].

Відомо, що фотосинтетичний апарат рослин реагує на дію будь-яких агротехнічних заходів певними перебудовами: зміною загальної кількості хлорофілу, співвідношення між його фракціями *a* та *b*, вмісту каротиноїдів, і тому вони є одними з найінформативніших для прогнозування майбутньої врожайності.

Процес фотосинтезу в основному складається з трьох етапів: первинна реакція, фотосинтетичний транспорт електронів і фотофосфорилування та асиміляція вуглецю. Хлорофіл *a* (*Chl a*) і хлорофіл *b* (*Chl b*) необхідні для первинної реакції. Молекула хлорофілу *a* у хлоропластах листка рослини виконує три найважливіші функції: вибірково поглинає енергію світла, запасає її у вигляді енергії електронного збудження та фотохімічно перетворює її на хімічну енергію первинних фотовідновлених і фотоокиснених сполук. Хлорофіл *b* та каротиноїди виконують функції додаткових і захисних пігментів, які захищають фотосинтетичний апарат від фотоокиснення, зумовленого зовнішніми чинниками, та відіграють ключову роль в енергетичному метаболізмі рослин пшениці.

Оскільки каротиноїди, крім безпосереднього внеску в процес фотосинтезу, беруть участь у захисному механізмі проти окисного стресу [23], можна вважати, що рослини пшениці полби, які вирощені з насіння, обробленого розчином 1r Seed Treatment, будуть мати посилений захист органічних молекул від руйнування вільними радикалами в процесах окиснення.

Особливо важливим є аналіз співвідношення вмісту хлорофілів *Chl a/Chl b*, що є одним із найважливіших показників того, як відбувається асиміляція діоксиду вуглецю в листі. Як відомо, *Chl a* і *Chl b* поглинають сонячне світло на різних довжинах хвилі (максимум поглинання *Chl a*  $\lambda_{\max} = 665$  нм, а

*Chl b*  $\lambda_{\max} = 649$  нм), тобто загальна кількість хлорофілу в листі (*Chl(a+b)*) і співвідношення (*Chl a/Chl b*) безпосередньо впливають на фотосинтетичну здатність рослин [24]. Це припущення було підтверджено з використанням кількох видів рослин у роботі [25]. Отже, співвідношення *Chl a/Chl b* може бути одним із визначальних факторів інтенсивності фотосинтезу та врожайності культури.

Аналіз співвідношення *Chl a/Chl b* у пігментному складі листя пшениці полби демонструє зменшення цього показника за органічної технології вирощування культури порівняно з традиційною на 4,8 % за передпосівної обробки насіння УФ-С-променями і на 11,2 % за використання гумінового препарату 1r Seed Treatment. Зменшення цього співвідношення зумовлене послідовним збільшенням фракції *Chl b* на 14,5 % (УФ-С-опромінення насіння) і на 20 % (обробка насіння розчином 1r Seed Treatment), тобто концентрація *Chl b* у листі пшениці змінилась під дією фактора передпосівної обробки більшою мірою, ніж концентрація *Chl a*. Зниження співвідношення *Chl a/Chl b* корелювало з істотним зростанням урожайності пшениці полби: за традиційної технології це співвідношення становило 1,88 (урожайність 4,26 т/га), за органічної технології і УФ-С-опромінення насіння – зменшилось до 1,79 (тобто на 4,8 %), а врожайність зросла на 21,4 %; за органічної технології та обробки насіння розчином 1r Seed Treatment – зменшилось до 1,67 (тобто на 11,2 %), а врожайність зросла на 31 %. Отримана обернена залежність між співвідношенням *Chl a/Chl b* та урожайністю статистично підтверджена коефіцієнтами кореляції: за традиційної технології –  $r = -0,028$ ; за органічної технології з УФ-С-опроміненням насіння –  $r = 0,048$ ; за органічної технології з обробкою насіння розчином 1r Seed Treatment –  $r = -0,967$ . Така залежність може бути пов'язана зі зміною ефективності роботи фотосинтетичного апарату внаслідок впровадження різних способів передпосівної обробки насіння, оскільки рослини неминуче реагують на різні агротехнічні заходи і коригують *Chl* (*Chl a*, *Chl b*, *Chl(a+b)*) і *Chl a/Chl b* для адаптації до заданих умов та оптимізації фотосинтезу, про що свідчать результати досліджень [26].

Автори дослідження [27] також отримали достовірну негативну кореляцію співвідношення *Chl a/Chl b* з урожайністю. Автори навіть припустили, що нижче співвідношення *Chl a/Chl b* може бути використане як ефективний показ-

ник для відбору високоврожайних сортів зернових. Вищий урожай зерна, отриманий у дослідженні, був результатом більшої маси 1000 зерен, що автори пов'язують з більшою тривалістю фотосинтезу, більшим вмістом хлорофілу та нижчим співвідношенням *Chl a/Chl b*.

Але зміни співвідношення не тільки *Chl a/Chl b*, а й (*Chl a+Chl b*):*Ct* можуть бути інформативним показником перебудови світлозбирального комплексу фотосистем рослин під впливом зовнішніх факторів [28]. У наших дослідженнях встановлено суттєві зміни співвідношення *Chl a/Chl b* у рослинах, де насіння опромінювали УФ-С-променями за обома технологіями вирощування. Так, при переході від традиційної до органічної технології, але за однакового способу передпосівної обробки насіння (УФ-С) співвідношення *Chl a/Chl b* зменшилось приблизно на 5 %, а (*Chl a+Chl b*):*Ct* зросло на 27,5 % за рахунок збільшення концентрації *Chl b* на 14,5 % і зменшення концентрації *Ct* на 14,9 %. Урожайність зросла на 21,4 %.

Однак за органічної технології вирощування і різних способів передпосівної обробки насіння спостерігали зменшення співвідношення *Chl a/Chl b* на 6,7 % та (*Chl a+Chl b*):*Ct* на 20,2 %, переважно за рахунок збільшення концентрації *Chl b* на 4,8 % і *Ct* на 25,5 %. Урожайність зросла лише приблизно на 8 %.

Таким чином, отримані результати свідчать про трансформації пігментного апарату рослин під час адаптації до різних способів передпосівної обробки насіння та технологій вирощування.

## Висновки

Досліджувані агротехнічні фактори – технологія вирощування та способи передпосівної обробки насіння – суттєво впливають на накопичення та співвідношення вмісту хлорофілів і каротиноїдів у листі пшениці полби (*Triticum dicoccum*, або *emmer wheat*).

Застосування органічної технології вирощування культури сприяло збільшенню вмісту зелених пігментів (*Chl a* і *Chl b*) та зменшенню вмісту каротиноїдів *Ct* у листі пшениці полби порівняно з традиційною технологією, що передбачала використання хімічних засобів захисту рослин та мінеральних добрив, за УФ-С передпосівної обробки насіння. Однак якщо між вмістом *Chl a* та врожайністю пшениці за органічної технології вирощування статистично встановлено кореляційну залежність із середнім

зв'язком ( $r = 0,603$ ), то між концентрацією *Chlb* та врожайністю спостерігали пряму залежність із сильним зв'язком ( $r = 0,9996$ ).

Найбільший показник врожайності пшениці було отримано за органічної технології вирощування та передпосівної обробки насіння гуміновим препаратом 1r Seed Treatment. Наявність сильної прямої залежності між вмістом хлорофілів *Chla* і *Chlb* та врожайністю підтверджується коефіцієнтами кореляції  $r = 0,994$  та  $r = 0,998$  відповідно. Перевищення врожайності за такої технології вирощування відносно традиційної становить 31 %.

Встановлено і статистично підтверджено обернену кореляційну залежність урожайності та співвідношення вмісту хлорофілів *Chla/Chlb* у листі пшениці за обох технологій вирощування. Таким чином, вміст фотосинтетичних пігментів та їх співвідношення можна використовувати як індикатори ефективності впроваджених елементів агротехнологій.

### Розкриття інтересів

Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

### References

- [1] Arzani A, Muhamad A. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2017 May;16(3):477-88. DOI: 10.1111/1541-4337.12262
- [2] Čurná V, Lacko-Bartošova M. Chemical composition and nutritional value of emmer wheat (*Triticum dicoccum* Schrank): A review. J Central Europ Agricult. 2017;18(1):117-34. DOI: 10.5513/JCEA01/18.1.1871
- [3] Lachman J, Miholova D, Pivec V, Jiri K, Janovska D. Content of phenolic antioxidants and selenium in grain of einkorn (*Triticum monococcum*), emmer (*Triticum dicoccum*) and spring wheat (*Triticum aestivum*) varieties. Plant Soil Environ. 2011;57(5):235-43. DOI: 10.17221/13/2011-PSE
- [4] Suchowilska E, Wiwart M, Kandler W, Krska R. A comparison of macro- and microelement concentrations in the whole grain of four *Triticum* species. Plant Soil Environ. 2012;58(3):141-7. DOI: 10.17221/688/2011-PSE
- [5] Peng J, Sun D, Nevo E. Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides* occupies a pivotal position in wheat domestication process. Aust J Crop Sci. 2011;5(9):1127-43.
- [6] Chayka TO. Preconditions for development of the market of organic products in Ukraine. Market Manag Innov. 2011;4(1):233-40.
- [7] Khalep Y, Moskalenko A. Ecological and economic aspects of the efficiency of Polissia organic plant models. Agric Resour Econ. 2020;6(4):5-19. DOI: 10.51599/ARE.2020.06.04.01
- [8] Horobets M, Chaika T, Korotkova I, Pysarenko P, Mishchenko O, Shevnikov M, et al. Influence of growth stimulants on photosynthetic activity of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) crops. Int J Botany Stud. 2021;6(2):340-5.
- [9] Crowder DW, Reganold JP. Financial competitiveness of organic agriculture on a global scale. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(24):7611-6. DOI: 10.1073/pnas.1423674112
- [10] Chaika T, Korotkova I, Barabolia O, Shokalo N, Chetveryyk O, Bilenko O, et al. Technological peculiarities of growing mustard and two-grained spelt (*Triticum Dicoccum* (Schrank) Schuebl) by organic farming methods. Int J Botany Stud. 2021;6(6):205-10.
- [11] Semenov A, Korotkova I, Sakhno T, Marenych M, Hanhur V, Liashenko V, et al. Effect of UV-C radiation on basic indices of growth process of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds in pre-sowing treatment. Acta Agricult Slovenica. 2020;116(1):49-58. DOI: 10.14720/AAS.2020.116.1.1563
- [12] Korotkova I, Marenych M, Hanhur V, Laslo O, Chetveryyk O, Liashenko V. Weed control and winter wheat crop yield with the application of herbicides, nitrogen fertilizers, and their mixtures with humic growth regulators. Acta Agrobot. 2021;74. DOI: 10.5586/AA.748
- [13] Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a, and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol. 1994;144(3):307-13. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- [14] Korotkova IV, Gorobets MV, Chaika TO. Influence of growth stimulants on productivity of spring barley varieties. Bulletin of Poltava State Agrarian Academy. 2021;2:20-30. DOI: 10.31210/visnyk2021.02.02
- [15] Korotkova IV, Chaika TO. Influence of mineral fertilizers, humic preparations and their mixtures on the intensity of growth processes and the content of photosynthetic pigments in winter wheat plants. In: Chaika TO, editor. Eco-oriented approaches to the restoration of man-made contaminated areas and the creation of sustainable ecosystems. Poltava: Astraia, 2022. p. 279-322.
- [16] Marenych MM, Markina IA, Hanhur VV, Len OI. Effectiveness of "Soilbiotics" application on winter wheat. Bulletin of Poltava State Agrarian Academy. 2018;3:22-6. DOI: 10.31210/visnyk2018.03.03

- [17] Cai R-G, Zhang M, Yin YP, Wang P, Zhang TB, Gu F, et al. Photosynthetic characteristics and antioxidative metabolism of flag leaves in responses to nitrogen application during grain filling of field-grown wheat. *Agric Sci China*. 2008;7(2):157-67. DOI: 10.1016/s1671-2927(08)60035-8
- [18] Melis A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Sci*. 2009;177(4):272-80. DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.06.005
- [19] Murchie EH, Pinto M, Horton P. Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *New Phytol*. 2009;181(3):532-52. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02705.x
- [20] Li N, Jia J, Xia C, Liu X, Kong X. Characterization and mapping of novel chlorophyll deficient mutant genes in durum wheat. *Breed Sci*. 2013; 63(2):169-75. DOI: 10.1270/jsbbs.63.169
- [21] Luo PG, Ren ZL. Wheat leaf chlorosis controlled by a single recessive gene. *J Plant Physiol and Mol Biol*. 2006;32:330-8.
- [22] Sui N, Li M, Meng QW, Tian JC, Zhao SJ. Photosynthetic characteristics of a super high yield cultivar of winter wheat during late grown period. *Agric Sci in China*. 2010;9(3):346-54. DOI: 10.1016/s1671-2927(09)60103-6
- [23] Campos MD, Nogales A, Cardoso HG, Campos C, Grzebelus D, Velada I, et al. Carrot plastid terminal oxidase gene (DcPTOX) responds early to chilling and harbors intronic pre-miRNAs related to plant disease defense. *Plant Gene*. 2016;7:21-5. DOI: 10.1016/j.plgene.2016.07.002
- [24] Li Y, He N, Hou J, Xu L, Liu C, Zhang J, et al. Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Front Ecol Evol*. 2018;6:64. DOI: 10.3389/fevo.2018.00064
- [25] Croft H, Chen JM, Luo X, Bartlett P, Chen B, Staebler RM. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Glob Change Biol*. 2017;23(9):3513-24. DOI: 10.1111/gcb.13599
- [26] Lawlor DW. Musings about the effects of environment on photosynthesis. *Ann Bot*. 2009;103(4):543-9. DOI: 10.1093/aob/mcn256
- [27] Yanyan Y, Peng H, Fengying D, Li N, Tingbo D, Keru W, et al. Improving photosynthesis to increase grain yield potential: an analysis of maize hybrids released in different years in China. *Photosynth Res*. 2021;150(1-3):295-311. DOI: 10.1007/s11120-021-00847-x
- [28] Ivanov LA, Ivanova LA, Ronzhina DA, Yudina PK. Changes in the chlorophyll and carotenoid contents in the leaves of steppe plants along a latitudinal gradient in South Ural. *Russ J Plant Physiol*. 2013;60(6):812-20. DOI: 10.1134/s1021443713050075

I.V. Korotkova<sup>1</sup>, T.O. Chaika<sup>2</sup>, T.P. Romashko<sup>1</sup>, A.M. Rybalchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Poltava State Agrarian University, Poltava, Ukraine

<sup>2</sup>Poltava Department of Ukrainian Academy of Technological Cybernetics Sciences, Poltava, Ukraine

#### PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS CONTENT IN EMMER WHEAT PLANTS AS CRITERIA OF PRODUCTIVITY IN TRADITIONAL AND ORGANIC FARMING TECHNOLOGY

**Background.** Estimation of chlorophyll and carotenoid content is an informative way to obtain ideas about the plants photosynthetic process and is an indirect method for assessing the productivity of plant crops, including cereals. As the worldwide interest at now for traditional and natural foods is growing, in the work we used one of the oldest grain crops – emmer wheat (*Triticum dicoccum* (Schrank.) Schuebl.) which was cultivated in traditional and organic farming system.

**Objective.** The study aim was to determine the role of chlorophyll and carotenoids in the emmer wheat productivity formation by traditional and organic farming technology under different pre-sowing seed treatment systems.

**Methods.** Field experiment was establishment during 2019–2021 on low-humus, hard-loam chernozems, the condition of which meets the “virgin land” criterion. The emmer wheat cultivation in organic technology was carried out in crop rotation: winter rye (green manure crop) – mustard (to improve the field phytosanitary condition and soil organic matter indicators) – emmer wheat. Two variants of pre-sowing seed treatment were studied: irradiation with ultraviolet light of the C range (100–280 nm) and seed treatment with 1r Seed Treatment humic preparation. The pre-sowing seed treatment in the traditional technology of the emmer wheat cultivation was carried out by the UV-C irradiation. In organic technology both UV-C irradiation and treatment with 1r Seed Treatment humic preparation of natural origin were used. Statistical data processing was performed by methods of descriptive statistics, regression and analysis of variance by the program Statistica 10.0. The experimental data significance was evaluated by using multifactor analysis of variance (ANOVA) to calculate the least significant difference (LSD<sub>05</sub>).

**Results.** It was found the use of UV-C seeds irradiation in organic and traditional cultivation technologies leads to increase in the chlorophyll *a* (*Chl a*) content by 9.2 % and chlorophyll *b* (*Chl b*) content by 14.5 % in plants grown by organic technology, however to decrease in carotenoid content (*Ct*) by 14.9 %. The increase in the photosynthetic pigments content by UV-C seeds irradiation lead to yield increase from 4.26 t/ha by the traditional technology to 5.17 t/ha by the organic technology, ie by 21.4 %. In organic technology based on the comparison of the photosynthetic apparatus main indicators of the emmer wheat and yield, the most effective method for seed treatment was determined. It was established that at result of 1r Seed Treatment humic preparation application in pre-sowing seed treatment, the *Chl a* concentration decreased by 2.4 %, the *Chl b* and *Ct* concentration increased by 5 and 25.5 %, respectively, compared with plants grown from UV-C irradiated seeds. When 1r Seed Treatment was used for pre-sowing treatment yield was 5.58 t/ha, while at UV-C seed treatment – 5.17 t/ha, ie, the yield increase was 8 %. An inverse correlation between the ratio of the photosynthetic pigments *Chl a/Chl b* content and the emmer wheat yield was determined.

**Conclusions.** According to the study results, it can be assumed that the introduction of organic farming technology with pre-sowing seed treatment by the 1r Seed Treatment humic preparation can increase the emmer wheat yield by 31% compared to the traditional technology. Thus, the photosynthetic pigments content and their ratio can be the effectiveness indicators of the implemented agricultural technologies.

**Keywords:** photosynthetic pigments; organic farming; pre-sowing seed treatment; crop rotation; UV-C irradiation; *Triticum dicoccum* wheat.

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ПЕТУНІЙ ІЗ ГЕНОМ ГЕТЕРОЛОГІЧНОЇ РИБОНУКЛЕАЗИ *ZRNase II*, ІНФІКОВАНИХ ВІРУСОМ ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ

А.О. Потрохов\*, Д.І. Сосновська, О.О. Овчаренко

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

\*Corresponding author: AlexGSMster@gmail.com

Received 4 April 2022; Accepted 27 May 2022

**Проблематика.** Постійні зміни умов навколишнього середовища викликають розвиток стрес-реакцій у рослинах. За умов помірної інтенсивності та тимчасової дії стресового чинника відбуваються посилення захисних систем, мобілізація енергетичних ресурсів. Однак якщо стресове навантаження має довготривалу дію, в клітинах розпочинаються процеси переокислення ліпідів (ПОЛ), пригнічення енергопродукції та зниження синтезу білка з подальшою його деструкцією. В умовах надмірного стресового навантаження відбувається балансування між антиоксидантною активністю (АОА) та ПОЛ, що є необхідним для підтримки нормальної життєдіяльності клітини. Проміжні продукти окиснення можуть слугувати індукторами та медіаторами стресового стану. Фітовірусна інфекція може призводити до патологічних змін в організмі рослини. Розвиток інфекційного процесу в організмі ураженої рослини пов'язаний зі стресовими реакціями та порушенням її нормальної життєздатності.

**Мета.** Оцінити ступінь розвитку стрес-реакцій, викликаних біотичними стресовими чинниками, у контрольних і трансгенних (з геном *ZRNase II*) рослин петунії.

**Методика реалізації.** Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) використовувався для інфікування рослин петунії. Ступінь розвитку стрес-реакцій у трансгенних рослин петунії з геном *ZRNase II* до та після інфікування ВТМ досліджували за показниками ПОЛ і АОА. В роботі використовували трансгенні рослини, отримані на основі двох генетично відмінних ліній петунії: М1 та Р5. Для оцінки розвитку ПОЛ визначали накопичення початкового та кінцевого продуктів: дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду.

**Результати.** Після трансформації рослин спостерігали зміни вмісту продуктів ПОЛ у тканинах листків. Трансгенні рослини мали на 10–15 % вищий вміст продуктів ПОЛ, що може свідчити про те, що трансформація сама по собі, в певних випадках, здатна призводити до розвитку стресових реакцій у рослин. Інфікування ВТМ сприяло активізації процесів, пов'язаних із захистом рослин від дії негативних факторів. Дослідження загальної АОА показали, що деякі трансгенні лінії рослини після інфікування мали істотно вищий рівень активності (18–30 %) порівняно з контролем, що може бути свідченням їх підвищеної життєздатності в стресових умовах.

**Висновки.** Позиційний ефект вбудовування Т-ДНК при генетичній трансформації може виступати стресовим фактором для рослини. Трансгенні лінії відрізнялись за показниками ПОЛ та АОА від рослин дикої типу та між собою. Після інфікування ВТМ у рослинах спостерігали зниження АОА в 4 рази. Ефективна експресія гена *ZRNase II* сприяє зменшенню вірусного навантаження в певних лініях. Лінії М1.2 та Р5.3 становлять найбільший інтерес для подальших вірусологічних досліджень, оскільки їх АОА активність була на 18–30 % вищою, ніж у контрольних рослин, що може вказувати на резистентність до вірусного ураження.

**Ключові слова:** трансгенні рослини; генетичні трансформації; петунія; вірус тютюнової мозаїки; стрес-реакції; переокиснення ліпідів; антиоксидантна активність.

### Вступ

Рослини в процесі свого росту та розвитку неодмінно стикаються зі стресовими чинниками різного походження. Для мінімізації наслідків негативного впливу стресу спрацьовують механізми захисту, які можуть бути забезпечені активацією генетичного апарату та зміною метаболізму клітин [1, 2]. Зміни умов навколишнього середовища викликають розвиток стрес-

реакцій у живих системах [3, 4]. За помірної інтенсивності та тимчасової дії стресового чинника відбуваються посилення захисних систем та мобілізація енергетичних ресурсів, однак за більш тривалого стресового впливу в клітинах розпочинаються процеси переокислення ліпідів, пригнічення енергопродукції та зниження синтезу білка з подальшою його деструкцією [5].

Одним із механізмів захисту рослин від дії стресових чинників є активація та посилення

перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), яка відбувається переважно під дією вільних радикалів. При нормальному функціонуванні організму без надмірних впливів стресових факторів активність ПОЛ незначна, однак вона змінюється за надмірних і довготривалих навантажень. У таких умовах відбувається балансування між антиоксидантною активністю (АОА) та ПОЛ, що є необхідним для підтримки нормальної життєдіяльності. Проміжні продукти окиснення можуть слугувати індукторами та медіаторами стресового стану [6]. На розвиток стрес-реакції рослин впливають різні чинники як абіотичного, так і біотичного походження [7–9].

Фітовірусна інфекція може призводити до патологічних змін в організмі рослини. Розвиток інфекційного процесу в організмі ураженої рослини пов'язаний зі стресовими реакціями та порушенням їх нормальної життєздатності [10]. Відомо, що при патологічному стані організму в тканинах накопичуються продукти перекисного окиснення ліпідів, що супроводжується порушенням функцій цілої низки ферментативних систем [11]. Для повноцінного уявлення про проходження ПОЛ у тканинах необхідно визначати вміст дієнових кон'югатів (ДК) як початкового продукту перекисного окиснення та малонового діальдегіду (МДА) як кінцевого продукту, а також показник протилежного процесу – загальної АОА у тканинах.

У цій роботі ми використали модельну систему вірус–рослина. За модельну рослину взято *Petunia hybrida*, яка була трансформована геном екстраклітинної рибонуклеази цинії (*ZRNase II*). Цей ген кодує фермент ендорибонулеазу, здатний розщеплювати РНК у міжклітинному просторі, що потенційно може бути використано для створення вірусостійких рослин. Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) було вибрано як класичний модельний вірус.

Мета нашої роботи – порівняти ступінь розвитку стрес-реакцій, викликаних біотичними стресовими чинниками, в контрольних і трансгенних (із геном *ZRNase II*) рослин петунії.

### Матеріали і методи

У роботі використовували трансгенні рослини, отримані на основі двох генетично відмінних ліній петунії: М1 та Р5.

Для отримання рослин із гетерологічним геном *ZRNase II* з цинії *Zinnia elegance* було використано метод *Agrobacterium* опосередкованої генетичної трансформації листкових дисків

(використовували *A. Tumefaciens*, штам AGL0, з вектором pbi-RNS). Для акліматизації рослин з умов *in vitro* до умов теплиці рослини висаджували в нейтральний торф'яний субстрат TS1 (Klasman, Латвія) за температури +24 °C та 16-годинного освітлення.

Вірусомісний матеріал було надано кафедрою вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Отриманим інокулятом проводили ураження листкових пластинок. Наявність вірусу в рослині визначали візуально за зміною морфології листків.

Для отримання екстрактів дослідний матеріал розтирали в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4), осад ресуспендували в тому ж буфері. Для визначення дієнових кон'югатів (ДК) до отриманого розчину додавали суміш гептану з ізопропіловим спиртом 1:1. Отриману суміш центрифугували 10 хв при 4000 г. Після центрифугування додавали дистильовану воду у співвідношенні 1/10 об'єму, розчин перемішували та відбирали гептанову фазу в кількості 1 мл. До неї додавали 96 %-вий етиловий спирт (5 мл). Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 233 нм у кварцових кюветах із ходом променя 10 мм [10].

Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали в екстрактах, отриманих за методикою, описаною вище. Гомогенат листя осаджували 5 %-вою трихлороцтовою кислотою та центрифугували 10 хв при 4000 г. Надосадову рідину переносили в пробірки і додавали 0,8 %-ву тіобарбітурову кислоту та нагрівали на водяній бані 10 хв за температури 100 °C. Оптичну густину розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 532 нм у кварцевих кюветах із ходом променя 10 мм [11].

Для визначення загальної антиоксидантної активності до отриманих дослідних зразків (методику отримання див. вище) додавали 0,2 мл 10 мМ розчину 2-дезоксирибози, 0,2 мл 0,1 мМ розчину комплексу Fe<sup>2+</sup>/EDTA та 0,2 мл 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Отриманий розчин доводили фосфатним буфером до об'єму 2 мл. Суміш інкубували 4 год за +37 °C. Після інкубації додавали 1 мл 2,8 %-вого розчину трихлороцтової кислоти і 1 мл 1 %-вого розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ розчину NaOH. Суміш нагрівали протягом 10 хв за 100 °C. Виміри оптичної густини проводили за довжини хвилі 532 нм на спектрофотометрі СФ-26 [12].

Для обробки статистичних даних використовували пакет програм MS Excel 2016.



## Результати

У ході проведених раніше досліджень нами було отримано рослини *Petunia hybrida*, що несуть цільовий ген екстраклітинної рибонуклеази цинії (*ZRNase II*) та селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptII*), який обумовлює стійкість до канаміцину. Аналіз на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) підтвердив наявність продуктів ампліфікації при використанні праймерів до *ZRNase II* та *nptII* генів (дані не представлено), що вказує на наявність обох генів. При ампліфікації з праймерами до *VirC* гена не отримали продуктів ампліфікації. Це свідчить про те, що зразки не були контаміновані агробактерією, наявність якої могла б привести до хибно позитивної ампліфікації генів до *ZRNase II* та *nptII* з плазмиди, а не з рослинного геному.

З метою оцінки стресостійкості дослідні рослини інфікували ВТМ. Через 1 місяць після інокуляції спостерігали візуальні ознаки прояву вірусної інфекції: деформацію листової пластинки, плямистість і хлоротичність. Наявність вірусу додатково підтверджена методом непрямого імуоферментного аналізу (дані не представлено). Для оцінки розвитку стрес-реакцій визначали показники накопичення продуктів ПОЛ і загальну АОА. Одночасно досліджували ПОЛ і АОА в рослинах дикого типу та трансгенних, які не були інфіковані. Отримані дані порівнювали між собою.

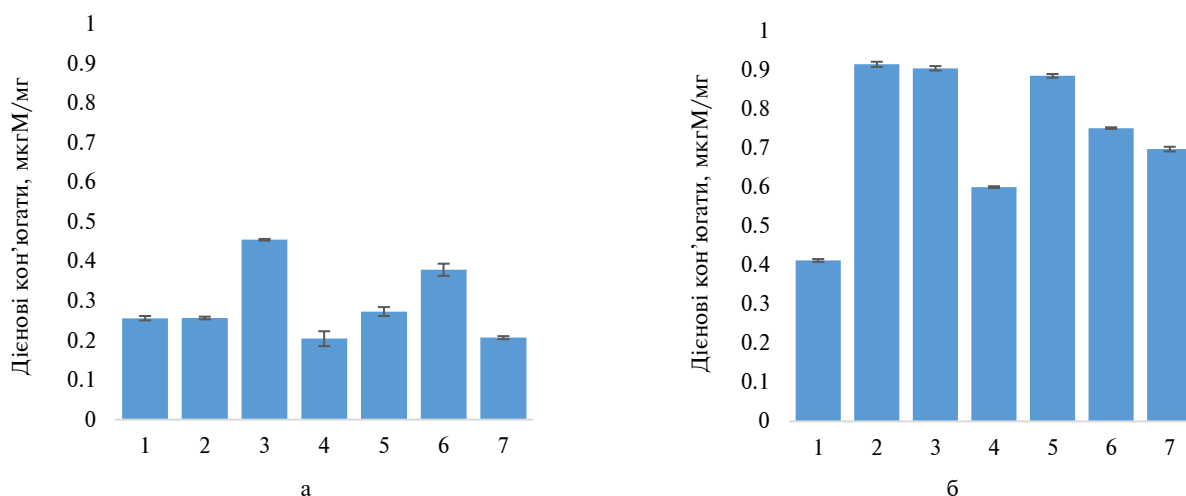
При порівнянні показників накопичення ДК (початкового продукту ПОЛ) у рослин ди-

кого типу та різних лініях трансгенних рослин виявили накопичення 0,25–0,30 мкгМ/мг, що вказує на відсутність достовірної різниці між рослинами дикого типу та трансгенними лініями P5.1, P5.3 та M1.2. У трансгенних лініях M1.1 та P5.2 рівень накопичення ДК був значно вищим і становив 0,4–0,45 мкгМ/мг (рис. 1).

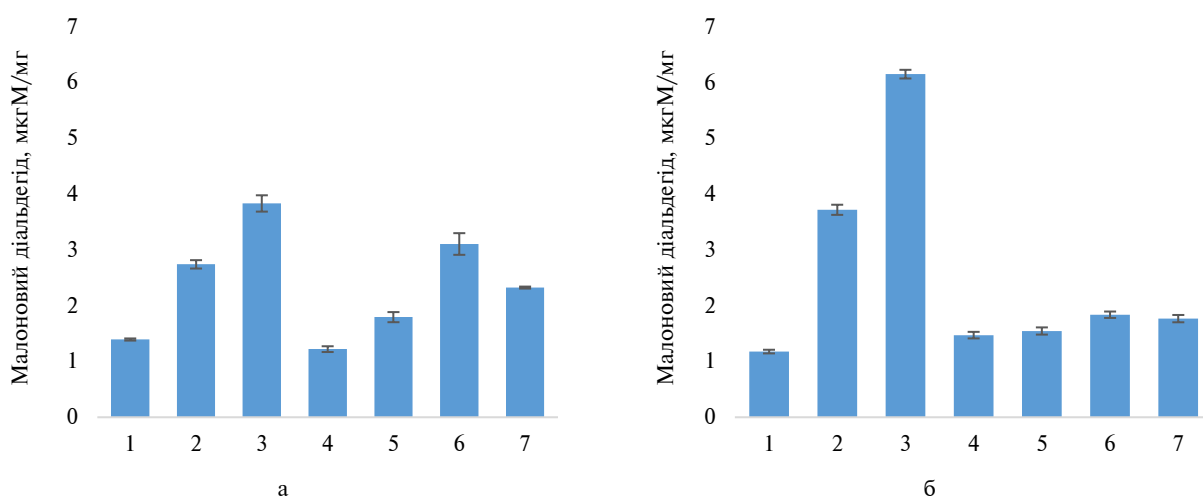
У трансгенних лініях рослин петунії та рослинах дикого типу після інфікування ВТМ відбувалося підвищення накопичення продуктів ПОЛ порівняно з незараженими рослинами. У трансгенних ліній P5.1 і P5.2 вміст ДК підвищувався порівняно з контролем у 2,2 разу, в той же час відмінності у рівні накопичення ДК між зараженими трансгенними лініями гібриду M1 демонстрували меншу відмінність порівняно із зараженими рослинами дикого типу.

При дослідженні в рослинах накопичення кінцевого продукту ПОЛ МДА було показано (рис. 2), що в трансформованих незаражених рослинах його вміст був вищим порівняно з незараженими рослинами дикого типу.

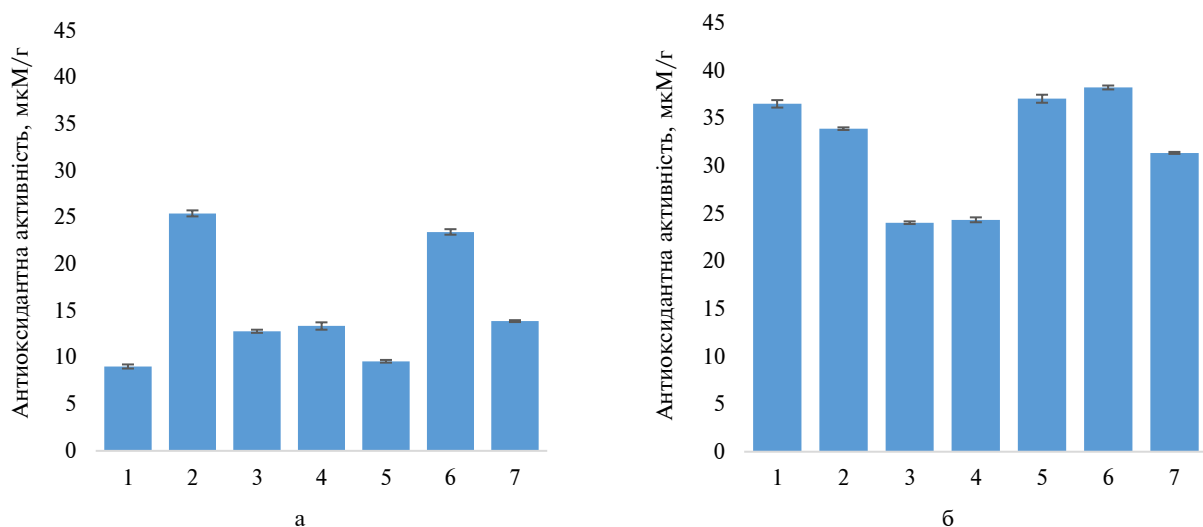
Дослідження рівня АОА в листках петунії здійснювали через визначення залишкового малону, який утворювався в процесі реакції з 2-дезоксирибозою (рис. 3). За високої АОА відбувається деградація малону, тому високі рівні залишкового малону вказують на низьку АОА. Було показано, що до інфікування контрольні рослини мали відносно високу АОА, яка становила 9,5 мкМоль/г. У листках трансгенних рослин P5.1 та M1.1 спостерігали меншу АОА, близько 23,4–25,4 мкМоль/г. Інші трансгенні лінії мали активність на рівні 12,0–13,3 мкМоль/г.



**Рисунок 1:** Вміст дієнових кон'югатів у неінфікованих (а) та інфікованих (б) рослинах петунії: 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини ліній P5 та M1 відповідно; 2–4 – незалежні трансгенні клони, отримані на основі лінії P5; 6, 7 – незалежні трансгенні клони, отримані на основі лінії M1



**Рисунок 2:** Вміст малонового діальдегіду в неінфікованих (а) та інфікованих (б) рослинах петунії: 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини ліній P5 та M1 відповідно; 2–4 – незалежні трансгенні клони, отримані на основі лінії P5; 6, 7 – незалежні трансгенні клони, отримані на основі лінії M1



**Рисунок 3:** Антиоксидантна активність у неінфікованих (а) та інфікованих (б) рослинах петунії: 1, 5 – нетрансформовані контрольні рослини ліній P5 та M1 відповідно; 2–4 – незалежні трансгенні клони, отримані на основі лінії P5; 6, 7 – незалежні трансгенні клони, отримані на основі лінії M1

Після інфікування ВТМ у рослинах спостерігали зниження АОА до 4 разів. У трансгенних інфікованих рослинах гібриду P5 усі рослини мали вищу АОА порівняно з контролем. Різниця між лініями P5.2, P5.3 та рослинами дикого типу становила 30 %. У трансгенних лініях M1.1 вона наближалась до контрольних значень, а у лінії M1.2 АОА була більшою на 18 %, ніж у контролі.

Отриманні нами трансгенні рослини відрізнялись від рослин дикого типу вищим рівнем АОА, що є свідченням їх підвищеної здатності до адаптації у відповідь на розвиток стресу, викликаний біотичним фактором. При інфікуванні

частина трансгенних ліній перевищували рослини дикого типу за адаптаційними характеристиками, що може бути пов'язано з ефективною експресією гена *ZRNase II*, яка сприяє зменшенню вірусного навантаження.

### Обговорення

Речовини, що проявляють АОА, відіграють значну роль у послабленні токсичної дії вільних радикалів, які своєю чергою спричиняють різного роду патологічні зміни в організмі. Підвищення рівня АОА рослин сприяє зростанню їх толерантності до дії різних стресових факто-

рів [3, 14, 15]. На розвиток ПОЛ і АОА може впливати ціла низка негативних факторів як біотичного, так і абіотичного характеру, зокрема солоність, надмірна вологість, важкі метали в ґрунті, посуха, бактеріальні та вірусні хвороби [16, 17]. Достеменно встановлено, що значенні фактори пригнічують ріст і розвиток рослин, призводять до зниження врожайності та загибелі організму [9]. Рослинні організми при впливі цих чинників активують свої захисні системи для протидії негативним впливам. Основними маркерами розвитку стресу є накопичення МДА і ДК [14]. Накопичення цих продуктів в організмі рослин є показником розвитку стресових явищ. Поряд із цим рослини можуть адаптуватися до дії негативних чинників через активацію механізмів, які пов'язані зі зниженням ПОЛ, а саме для перешкодження окисдативним пошкодженням активується цикл ферментативних захисних реакцій, спрямованих на протидію стресу [13].

Відомо, що в процесі розвитку стрес-реакції відбуваються зміни в накопиченні продуктів ПОЛ [14, 15]. У наших дослідженнях було показано, що у трансформованих незаражених рослинах, за винятком двох ліній, активність ПОЛ була на рівні контрольних незаражених рослин дикого типу. В інфікованих контрольних рослинах дикого типу фітовірусна інфекція спричинювала посилення процесів ПОЛ, активацію метаболічних процесів і загалом розвиток стрес-реакцій. Можна припустити, що рівень адаптивної активності у контрольних рослин за наявності фітовірусної інфекції був нижчим, ніж у трансформованих рослинах. Отримані дані також свідчать, що не лише фітовірусна інфекція, а й сама трансформація може розглядатися як біотичний стресовий чинник.

Відомо [15, 16], що висока АОА є ознакою підвищеної стійкості до стресу, а отже, як наслідок, і більшої життєздатністю. Отримані на-

ми трансгенні рослини відрізнялись від рослин дикого типу вищим рівнем АОА, що є свідченням їх підвищеної здатності до адаптації у відповідь на розвиток стресу, викликаний біотичним фактором.

Таким чином, наші дослідження вказують на те, що при трансформації рослин важливим фактором, який впливає на адаптацію рослин до стресових умов, є позиційний ефект при вбудовуванні Т-ДНК. Кожна отримана рослина трансгенна лінія є унікальною, оскільки вбудовування генів при агробактеріальній трансформації відбувається вибірково і не прив'язане до певної ділянки, різні лінії можуть реагувати на один і той самий стресовий фактор по-різному.

### Висновки

Трансгенні лінії відрізняються за показниками ПОЛ та АОА від рослин дикого типу та між собою, що може бути наслідком вбудовування вставки чужорідної ДНК у геном. Позиційний ефект при вбудовуванні Т-ДНК при генетичній трансформації може виступати стресовим фактором для рослини. Лінії М1.2 та Р5.3 становлять найбільший інтерес для подальших вірусологічних досліджень, оскільки їх АОА активність була на 18%-30% вищою ніж у контрольних рослин, що може вказувати на підвищену резистентність до вірусного ураження. Адаптаційні характеристики трансгенних рослин можуть бути пов'язані з ефективною експресією гена *ZRNase II*, яка сприяє зменшенню вірусного навантаження в певних лініях.

### Розкриття інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів для розкриття.

### References

- [1] Atkinson NJ, Urwin PE. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot.* 2012 Jun;63(10):3523-43. DOI: 10.1093/jxb/ers100
- [2] Qamer Z, Chaudhary MT, Du X, Hinze L, Azhar MT. Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. *J Cotton Res.* 2021;4(1):9. DOI: 10.1186/s42397-021-00086-4
- [3] Kowalczewski PE, Radzikowska D, Ivanišová E, Szwengiel A, Kačániová M, Sawinska Z. Influence of abiotic stress factors on the antioxidant properties and polyphenols profile composition of green barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 8;21(2):397. DOI: 10.3390/ijms21020397
- [4] Nicky J. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot.* 2012 Jun;63(10):3523-43. DOI: 10.1093/jxb/ers100

- [5] He M, He CQ, Ding NZ. Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Front Plant Sci.* 2018 Dec 7;9:1771. DOI: 10.3389/fpls.2018.01771
- [6] Vahdati K, Leslie C, editors. Abiotic stress – plant responses and applications in agriculture. InTechOpen; 2013. 410 p. DOI: 10.5772/45842
- [7] Kusvuran S, Kiran S, Ellialtioglu SS. Antioxidant enzyme activities and abiotic stress tolerance relationship in vegetable crops. In: Shanker AK, Shanker C, editors. Abiotic and biotic stress in plants. InTechOpen; 2016. DOI: 10.5772/62235
- [8] Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, Kuča K, Jačević V. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. *Front Plant Sci.* 2021 Jan 6;11:552969. DOI: 10.3389/fpls.2020.552969
- [9] Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Biomed Res Int.* 2019 May 8;2019:9732325. DOI: 10.1155/2019/9732325
- [10] Lapikova VP, Gaivorovskaya LM, Averyanov AA. Possible participation of reactive oxygen species in double induction of anti-infectious plant reactions. *Physiol Plants* 2000;47(1):161-2.
- [11] Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* 2006 Jan;11(1):15-9. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.11.002
- [12] Sibgatullina GV, Khaertdinova LR, Gumerova EA, Akulov AN, Kostyukova YA, Nikonorova NA, et al. Methods for determining the redox status of cultivated plant cells. Kazan: Kazan Federal University; 2011. 61 p.
- [13] Anwar A, Kim JK. Transgenic breeding approaches for improving abiotic stress tolerance: recent progress and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr;21(8):2695. DOI: 10.3390/ijms21082695
- [14] Waqas Muhammad Ahmed, Kaya Cengiz, Riaz Adeel, et al. Potential mechanisms of abiotic stress tolerance in crop plants induced by thiourea. *Front Plant Sci.* 2019 Oct 29;10:1336. DOI: 10.3389/fpls.2019.01336
- [15] Khaleghi A, Naderi R, Brunetti C, Maserti BE, Salami SA, Babalar M. Morphological, physiochemical and antioxidant responses of *Maclura pomifera* to drought stress. *Sci Rep.* 2019 Dec 17;9(1):19250. DOI: 10.1038/s41598-019-55889-y
- [16] Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Front Plant Sci.* 2017 Apr 18;8:537. DOI: 10.3389/fpls.2017.00537
- [17] Baillo EH, Kimotho RN, Zhang Z, Xu P. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes (Basel).* 2019 Sep 30;10(10):771. DOI: 10.3390/genes10100771

A.O. Potrohov, D.I. Sosnovskaya, O.O. Ovcharenko

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

#### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PETUNIAS WITH THE HETEROLOGOUS RIBONUCLEASE *ZRNase II* GENE INFECTED WITH TOBACCO MOSAIC VIRUS

**Background.** Constant changes in environmental conditions cause the development of stress reactions in plants. Under conditions of moderate intensity and temporary action of the stress factor, the strengthening of protective systems and the mobilization of energy resources take place. However, if the stress factor has a long-term effect, the cells begin the processes of lipid peroxidation (LPO), inhibition of energy production and reduction of protein synthesis with its subsequent destruction. Under conditions of excessive stress, there is a balance between antioxidant activity (AOA) and LPO, which is necessary to maintain normal cell function. Oxidation intermediates can serve as inducers and mediators of stress. Phytovirus infection can lead to pathological changes in the body of a plant. The progression of the infectious process in the body of the affected plant is associated with stress reactions and disruption of its normal viability.

**Objective.** We are aimed to assess the degree of progress of stress reactions caused by biotic stressors in control and transgenic (with *ZRNase II* gene) petunia plants.

**Methods.** Tobacco mosaic virus (TMV) was used to infect petunia plants. The degree of progress of stress reactions in transgenic petunia plants with the *ZRNase II* gene before and after infection with TMV was studied by POL and AOA indicators. Two genetically distinct lines of petunia (M1 and P5) were used to obtain transgenic plants. To assess the progress of LPO, the accumulation of initial and final products (diene conjugates and malonic dialdehyde) was determined.

**Results.** After the plants transformation, changes in the content of LPO products in leaf tissues were observed. Transgenic plants had a 10–15% higher content of LPO products, which may indicate that the transformation, in some cases, can lead to the progress of stress reactions in plants. Infection with TMV has contributed to the intensification of processes related to the protection of plants from the effects of negative factors. Studies of total AOA have shown that transgenic plants after infection had significantly higher levels (18–30%) of AOA compared with controls, which may be evidence of their increased viability under stress.

**Conclusions.** The positional effect of T-DNA incorporation in genetic transformation may be a stressor for the plant. Transgenic lines differ in terms of LPO and AOA from non-transgenic lines and from each other. After infection with TMV, a 4-fold decrease in AOA was observed in the plants. Effective expression of the *ZRNase II* gene helps to reduce viral load in certain lines. Lines M1.2 and P5.3 are of greatest interest for further virological studies, as their AOA activity was 18–30% higher than in control plants, which may indicate resistance to viral infection.

**Keywords:** transgenic plants; genetic transformation; petunia; tobacco mosaic virus; stress reactions; lipid peroxidation; antioxidant activity.