

МРНТИ: 62.09.39

А.И.БАЙДАЛИНОВ<sup>1\*</sup>, О.Н.ШЕМШУРА<sup>1</sup>, Э.Т. ИСМАИЛОВА<sup>1</sup>, Г.Т.ДЖАКИБАЕВА<sup>1</sup>,  
Д.А.ТЛЕУБЕКОВА<sup>1</sup>, Г.Б.БАЙМАХАНОВА<sup>1</sup>, Ш.Т.КЕНЖЕЕВ<sup>2</sup>

\*arsimv@mail.ru

<sup>1</sup>ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,  
Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> «Казахский национальный аграрный университет», Алматы, Казахстан

## ОЦЕНКА БИОБЕЗОПАСНОСТИ ШТАММА *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* *MB40*, ПЕРСПЕКТИВНОГО В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ БИОПРЕПАРАТА ПРОТИВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.03

### Аннотация

Проведена оценка факторов патогенности(токсичности) и аллергенности штамма *Bacillus amyloliquefaciens* MB40, перспективного в борьбе с бактериальным ожогом. Установлено, что штамм бактерии *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 не является патогенным, относится к 4-му классу опасности, и может быть использован в качестве основы для создания биопрепарата против бактериального ожога плодовых культур.

**Ключевые слова:** вирулентность, биобезопасность, сенсбилизация, токсичность, аллергенная опасность, патогенность.

Применение современных биологических знаний, развитие биотехнологии открывают широкие возможности решения проблем аграрного сектора, ветеринарии, пищевой промышленности, здравоохранения, фармакологии, охраны окружающей среды. Благодаря научным достижениям в области микробиологии и внедрению новых разработок генной инженерии, стало возможным получение высокотехнологичных штаммов микроорганизмов с повышенной продуктивностью [1-7]. Одним из этапов при внедрении в производство препаратов на основе культур микроорганизмов или их производных является оценка их биобезопасности - изучение патогенности, вирулентности, аллергенности [8-10].

Под аллергизирующими свойствами понимают способность того или иного вещества вызывать при введении в организм состояния повышенной чувствительности (сенсбилизация, гиперчувствительность), в основе которой лежат различные иммунопатологические механизмы. Ранее считалось, что в отличие от химических веществ биологические препараты не обладают существенным разрушающим действием на живые организмы, не нарушают связей биоценоза, не влияют на важнейшие экологические факторы [11]. Однако, кроме положительных сторон микробиологических производств, необходимо отметить следующие негативные моменты: в ряде производств до сих пор используются патогенные и условно-патогенные микроорганизмы для теплокровных животных и человека, предприятия микробиологического синтеза характеризуются наличием неблагоприятных факторов производственной среды, вредных выбросов в атмосферный воздух, образованием сточных вод, а также твердых отходов; продукты микробиологического синтеза могут оказывать неспецифическое и специфическое действие, прежде всего, вызывая сдвиги иммунологического гомеостаза и изменяя ассоциацию аутофлоры человека и животных.

Следовательно, вместе с видимым положительным эффектом применения продуктов современной биотехнологии, при производстве и использовании

микроорганизмов и биопрепаратов на их основе возможно загрязнение ими производственной среды, с выделением токсических веществ в воздух рабочей зоны и атмосферы с вредным воздействием на здоровье работников. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что биотехнологические штаммы микроорганизмов представляют серьезную опасность как для человека, так и для объектов окружающей среды [12-19]. Поэтому одним из актуальных направлений современных гигиенических исследований является оценка биологической безопасности биотехнологических производств и вероятности возникновения неблагоприятных для здоровья человека последствий [20].

Целью работы было изучение биобезопасности перспективного штамма *Bacillus amyloliquefaciens* MB40, исследование в модельных экспериментах вредных свойств штамма, степени токсичности (класс опасности) и сенсибилизирующей активности.

### **Материалы и методы исследования**

Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 выделен из бессимптомных листьев яблони сорта «Заря Алатау», произрастающей в Карасайском районе Алматинской области Казахстана в 2018 году. Штамм идентифицирован секвенированием фрагментов гена 16S rRNA с использованием набора Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно протокола производителя (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems США), с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3500 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems США).

Для штамма *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 установлена ингибирующая активность в отношении возбудителя бактериального ожога *Erwinia amylovora* [21-22].

Оценку биобезопасности штамма *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 исследовали на лабораторных животных: нелинейных белых мышах, морских свинках и кроликах, полученных из питомника лабораторных животных с ветеринарными паспортами здоровья. Содержание животных соответствовало санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), кормление животных осуществлялось натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами [23]. Животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 14 дней. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя. При проведении экспериментов ежедневно наблюдали за общим состоянием животных, потреблением корма и воды; один раз в неделю определяли массу тела. Соблюдали циркадный ритм.

Наблюдение за состоянием лабораторных животных проводили ежедневно в утреннее время. Визуально контролировали и регистрировали количество больных и сроки болезни или гибели животных, клинические симптомы интоксикации (изменение поведения, внешнего вида, пище- и водопотребления, реакций на внешние раздражители, частоты дыхания, окраски ушей и конечностей, наличие мимических подергиваний и тремора конечностей, развития наркотического и коматозного состояния и др.) и раздражения слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта (срыгивание, слюнотечение, изменение характера испражнений и др.).

Определение вирулентности штамма (LD<sub>50</sub>). Исследование токсичности проводили на белых беспородных половозрелых мышах обоего пола массой 18-24 гр. Животные распределялись по группам случайным образом. В качестве критерия приемлемой рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболевания и гомогенность групп по массе тела.

Экспериментальным животным, разделенных на 4 группы по 12 особей в каждой, состоящих из нелинейных белых мышей, интраперитонеально вводили культуру *Bacillus amyloliquefaciens MB40* в концентрациях  $10^3, 10^5, 10^7, 10^9$  КОЕ/мл.

Для выявления диссеминации бактерий в органы животных опытных групп на протяжении 15 суток перорально вводили суточную культуральную жидкость бактерий, полученную путем культивирования исследуемого штамма на мясо-пептонном бульоне в концентрациях  $10^3, 10^5, 10^7, 10^9, 10^{11}$  КОЕ/мл на животное. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор [24].

### Результаты и обсуждение

Исследование острой токсичности штамма *Bacillus amyloliquefaciens MB40* показало, что при внутрибрюшинном введении культуры в концентрациях  $10^3, 10^5, 10^7$  КОЕ/мл выжили все животные. При использовании концентраций  $10^3, 10^5, 10^7$  КОЕ/мл видимых поведенческих и физиологических изменений не наблюдалось. При концентрации  $10^9$  КОЕ/мл заболело 1 животное на 2 сутки. При пероральном введении на 2 сутки после введения культуры заболело 2 животных в концентрации  $10^{11}$  КОЕ/мл, наблюдалось уменьшение аппетита, подвижности, взъерошенный мех. На 4 сутки животные выздоровели, на 25 сутки гибели животных не отмечено.

Таблица 1 - Исследование острой токсичности штамма *Bacillus amyloliquefaciens MB40* при внутрибрюшинном и пероральном введении

№№	К-во животных в опыте	Способ введения	Концентрация, КОЕ/мл	Кол-во заболевших животных	Летальность животных	Кол-во выживших животных
1	12	В/брюшинно	$10^3$	0	0	12
2	12	В/брюшинно	$10^5$	0	0	12
3	12	В/брюшинно	$10^7$	0	0	12
4	12	В/брюшинно	$10^9$	1	0	12
Контроль	12	В/брюшинно	Физ.р-р	0	0	12
5	12	Перорально	$10^5$	0	0	12
6	12	Перорально	$10^7$	0	0	12
7	12	Перорально	$10^9$	0	0	12
8	12	Перорально	$10^{11}$	2	0	12
Контроль	12	Перорально	Физ.р-р	0	0	12

### Исследование аллергенного действия штамма *Bacillus amyloliquefaciens MB40*.

Исследования проводили на 4 морских свинках, весом 250-350 гр., сформированные по однородной массе (разница не более 10%), поведению и состоянию, с чистой здоровой кожей без механических повреждений на разведениях культур в концентрациях  $10^3, 10^5, 10^7$  КОЕ/мл. За 1 сутки до начала эксперимента на симметричных участках боковых поверхностей туловища лабораторных животных ножницами или электрической машинкой выстригали кожные «окошки» (опытные и контрольные) площадью 6см×2см. Кожные пробы у опытных и контрольных животных ставили на

одних и тех же участках боковой поверхности туловища. В качестве контроля использовали физиологический раствор. Реакцию кожи учитывали с помощью колориметрической линейки С.В.Суворова через 24 часа и оценивали в баллах по следующей шкале:

0 - видимой реакции нет;

1 - бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

2 - ярко-розовая эритема по всему участку или по его периферии;

3 - красная эритема по всему участку;

4 - инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы.

При изучении аллергенного действия на морских свинках видимой реакции не выявлено.

#### Изучение штамма на способность повреждать конъюнктивальную оболочку глаза.

Исследования проводили на 2 кроликах, весом 2,5-3 кг. Для постановки пробы подопытным животным 1 каплю взвеси раствора аллергена, в 1мл которой содержится  $10^9$  КОЕ, вводили глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко, а во второй глаз (контрольный) - 1 каплю дистиллированной воды. Закапывание производили при положении животного лежа головой вниз [25]. При изучении действия штамма *Bacillus amyloliquefaciens MB40* на конъюнктивальную оболочку глаза на 3 сутки наблюдения зафиксирована реакция в виде незначительных слизистых выделений из глаз кроликов, затем реакция полностью исчезала в течение 7 суток и далее отклонений от нормы не наблюдалось [26].

Патогенность микроорганизма оценивали по выживаемости инфицированных животных, их внешнему виду и поведению, высеваемости бактерий из крови и органов в различные сроки после заражения, а также макроскопической картине внутренних органов.

На основании отсутствия гибели животных и каких-либо патологических изменений в их внешнем виде и общем поведении на протяжении 25-дневного наблюдения, отрицательных результатов микробиологического анализа сердца, легких, печени, селезенки и крови, и по результатам исследований на аллергенное и местно-раздражающее действие, сделан вывод, что штамм бактерии *Bacillus amyloliquefaciens MB40* не является патогенным, относится к 4-классу опасности, и может быть использован в качестве основы для создания биопрепарата против бактериального ожога плодовых культур.

#### **Литература:**

- 1 Егорова Т.А., Клунова С.М., «Основы биотехнологии», 3-изд. М.: Академия,2006. 208 с
- 2 Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. «Биотехнология» М.: Академия, 2006-254с
- 3 Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии-продуценты биологически активных веществ-Киев: Наукова думка, 1982-280 с
- 4 Шлегель Г.Г. «Общая микробиология: Пер. с нем.- М.: Мир, 1987-567 с
- 5 Бери Д. Биология дрожжей. М.: Мир, 1985 - 95 с
- 6 Дудикова Г.Н. Биотехнологические основы использования лактобацилл для защиты зерновых продуктов от бактериальной контаминации: Дисс. докт. биол. наук- Алматы,2002,-320 с
- 7 Каталог культур микроорганизмов- Астана,2003. -186с
- 8 Руководство к практическим занятиям по микробиологии/ Под ред. Н.С. Егорова - М.: Московский университет, 1995-220 с
- 9 Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований - М.: Медицина, 1978. -392 с
- 10 Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования /Под ред М.О. Биргер- М.: Медицина,1982-462 с.

11 Бондаренко, Н.В. Состояние и перспективы развития биологического метода защиты растений в СССР / Н.В. Бондаренко, К.Е. Воронин, Ш.М. Гринберг // С.-х. биология – 1979, – Т. 14, № 6 – С. 675–682.

12 Багдасарьян, Г.А. Токсиколого-гигиеническая оценка действия дрожжеподобных грибов рода *Candida* на организм теплокровных животных и человека / Г.А. Багдасарьян, Н.П. Сергеук // Токсиколог. вестн. – 1994. – № 6. –С. 18–21.

13 Баширова, Р.М. Токсиколого-гигиеническая характеристика бактериального меприна: автореф. дис.канд. биол. наук.: 14.00.07 / Р.М. Баширова. – М., 1989. – 107 с.

14 Немыря, В.И. Результаты динамических исследований состояния здоровья населения в районе расположения предприятий по производству кормового белка /В.И. Немыря, Ю.Н. Никитина // Факторы окружающей среды и здоровье населения: сб. науч. тр. – М., 1988. – С. 99–104.

15 О влиянии факторов биотехнологического производства на реактивность иммунной системы / Л.Б. Захарова [и др.] // Медицина труда и пром.экология. – 1994.– № 10. – С. 17–18.

16 Омельянец, Т.Г. Гигиенические аспекты охраны окружающей среды в связи с применением в сельском хозяйстве микробных препаратов на основе неспорообразующих микроорганизмов: автореферат диссертации д-ра медицинских наук / Т.Г. Омельянец. – М., 1982. – 38 с.

17 Пивоваров, Ю.П. Промышленные микроорганизмы причины возможного негативного действия на окружающую среду и здоровье людей / Ю.П. Пивоваров, В.В. Королик // Токсикологический вестник – 1994. – № 6. – С. 13–16.

18 Сергеук, Н.П. Научные основы оценки опасности и гигиенической регламентации промышленных микроорганизмов: автореферат диссертации д-ра медицинских наук: 14.00.07 / Н.П. Сергеук; ФНЦ гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана. – Мытищи, 2004. – 34 с.

19 Соседова, Л.М. Токсико-гигиеническая оценка изолированного и сочетанного действия биологического фактора / Л.М. Соседова, В.С. Рукавишников // Тезисы докладов 2-ого съезда токсикологов России / Москва, 10-13 ноября 2003 г. – М., 2003. – С. 244–245.

20 Израйлет, Л.И. В.Н. Слинко, Е.П. Седышева; Методические указания в постановке исследований по гигиеническому нормированию микробных препаратов в воздухе рабочей зоны /МЗ Латв.ССР. – Рига, 1978. – 3 с.

21 Молжигитова А.Е. Саданов А.К., Исмаилова Э.Т., Искандарова К.А., Шемшура О.Н., Сейтбатталова А.И. Антагонистический потенциал эпифитных бактерий, выделенных в Казахстане, против *Erwinia amylovora*, возбудителя бактериального ожога // 20-я конференция ICBE по биоразнообразию и экосистемам. Том:12, №:11- Токуо, 2018.

22 Шемшура О.Н., Алимжанова М., Исмаилова Э., Молжигитова А., Даугалиева С., Саданов А. Антагонистическая активность и механизм действия нового штамма *Bacillus amyloliquefaciens MB40* против бактериального ожога. Журнал патологии растений. – 2020. – 102(3), P. 825–833.

23 "Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)" (утв. Главным государственным санитарным врачом СССР 06.04.1973 N 1045-73) (вместе с "Правилами гуманного обращения с лабораторными животными")

24 Адо А.Д. Общая аллергология. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. А. Д. АДО. М., «Медицина», 1978, с. 464 с иллюстрациями 1978

25 Методические указания №2955 «Постановка исследований для обоснования ПДК производственных штаммов и на основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны» - М.1983.12.23

26 Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм в объектах окружающей среды. –М., 1993.

А.И. БАЙДАЛИНОВ<sup>1\*</sup>, О.Н. ШЕМШУРА<sup>1</sup>, Э.Т. ИСМАИЛОВА<sup>1</sup>, Г.Т. ДЖАКИБАЕВА<sup>1</sup>,  
Д.А. ТЛЕУБЕКОВА<sup>1</sup>, Г.Б. БАЙМАХАНОВА<sup>1</sup>, Ш.Т. КЕНЖЕЕВ<sup>2</sup>

\*arsimv@mail.ru

<sup>1</sup>ЖШС «Микробиология және вирусология институты ғылыми-өндірістік орталығы»,  
Алматы, Қазақстан

<sup>2</sup>Қазақ Аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан

## ЖЕМІС DAҚЫЛДАРЫНЫҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙГІНЕ ҚАРСЫ БИОЛОГИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТ НЕГІЗІ РЕТІНДЕ АЛЫНАТЫН ПЕРСПЕКТИВТІ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* MB 40 ШТАМЫНЫҢ БИОҚАУПСІЗДІК СЫНАҒЫНАН ӨТКІЗУ

### Түйін

Өндірісте микроорганизмдердің дақылдарын қолданған кезде олардың қоршаған ортаға биологиялық қауіпсіздігін бағалау қажет. Осыған байланысты біз бактериялық күйіктермен күресте болашағы бар *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 штаммының патогенділік факторларын - уыттылығын, аллергенділігін бағаладық. Ол үшін уыттылық (патогенділік) дәрежесін бағалау, сенсбилизацияны жаңғырту және анықтау үшін қолданылатын әдістер. Жұмыс барысында бұл объектінің патогенді факторы жоқ екендігі анықталды.

**Кілтті сөздер:** вируленттілік, биологиялық қауіпсіздік, сенсбилизация, уыттылық, шартты түрде патогенді.

IRSTI: 62.09.39

A.I. BAIDALINOV<sup>1\*</sup>, O.N. SHEMSHURA<sup>1</sup>, E.T. ISMAILOVA<sup>1</sup>,  
G.T. DZHAKIBAYEVA<sup>1</sup>, D.A. TLEUBEKOVA<sup>1</sup>, G.B. BAIMAKHANOVA<sup>1</sup>,  
SH.T. KENZHEEV<sup>2</sup>

\*arsimv@mail.ru

<sup>1</sup>LLC «Research and Production Center of Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan

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

## ESTIMATION OF THE BIOSAFETY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* MB40 STRAIN, PROMISING AS A BASIS OF BIOPREPARATION AGAINST BACTERIAL BURN OF FRUIT CROPS

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.03

### Summary

The cultures application of microorganisms in the production of biological products, it is necessary to assess their biosafety for the environment. In this regard, we assessed the factors of pathogenicity (toxicity) and allergenicity of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* MB40, which is promising in the fight against bacterial burns. For this, the methods used to assess the degree of toxicity (pathogenicity), reproduce and identify sensitization. It has been established that the bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 is not pathogenic, belongs to the 4th hazard class, and can be used as a basis for creating a biological product against bacterial burns of fruit crops.

**Key words:** virulence, biosafety, sensitization, toxicity, allergenic hazard, pathogenicity.

The use of modern biological knowledge, the development of biotechnology open up wide opportunities for solving problems in the agricultural sector, veterinary medicine, food industry, health care, pharmacology, and environmental protection. Thanks to scientific

advances in microbiology and the introduction of new developments in genetic engineering, it has become possible to obtain high-tech strains of microorganisms with increased productivity [1-7]. One of the stages in the introduction of microorganism cultures or their derivatives into the production of preparations is the assessment of their biosafety - the study of pathogenicity, virulence, allergenicity [8-10].

Allergenic properties are understood as the ability of a substance to cause, when introduced into the body, a state of hypersensitivity (sensitization, hypersensitivity), which is based on various immunopathological mechanisms. It was previously believed that, unlike chemicals, biological preparations do not have a significant destructive effect on living organisms, do not violate the links of the biocenosis, and do not affect the most important environmental factors [11]. However, in addition to the positive aspects of microbiological industries, the following negative points should be noted: in a number of industries, pathogenic and opportunistic microorganisms are still used for warm-blooded animals and humans, microbiological synthesis enterprises are characterized by the presence of unfavorable factors of the production environment, harmful emissions into the atmospheric air, formation waste water, as well as solid waste; products of microbiological synthesis can have a nonspecific and specific effect, first of all, causing shifts in immunological homeostasis and changing the association of human and animal autoflora.

Therefore, along with the visible positive effect of the use of modern biotechnology products, in the production and use of microorganisms and biological products based on them, it is possible for them to pollute the working environment, the air of the working area with a harmful effect on the health of workers. Numerous literature data indicate that biotechnological strains of microorganisms pose a serious danger to both humans and environmental objects [12-19]. Therefore, one of the topical areas of modern hygienic research is the assessment of the biological safety of biotechnological industries and the likelihood of adverse consequences for human health [20].

The aim of the work was to study the biosafety of the promising strain of *Bacillus amyloliquefaciens* MB40, to study in model experiments the harmful properties of the strain, the degree of toxicity (hazard class) and sensitizing activity.

### **Materials and methods examination**

The *Bacillus amyloliquefaciens* strain MB40 was isolated from asymptomatic leaves of the «Zarya Alatau» apple tree growing in the Karasai district of the Almaty region of Kazakhstan in 2018. The strain was identified by sequencing fragments of the 16S rRNA gene using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, Applied Biosystems USA), with subsequent separation of the fragments on an automatic genetic analyzer 3500 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems USA).

For the *Bacillus amyloliquefaciens* strain MB40, inhibitory activity against the bacterial burn causative agent *Erwinia amylovora* was established [21-22].

The assessment of the biosafety of the *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain was studied on laboratory animals: nonlinear white mice, guinea pigs and rabbits obtained from a laboratory animal nursery with veterinary health certificates. The keeping of animals corresponded to the sanitary rules for the design, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums), the animals were fed with natural and briquetted feed in accordance with the standards [23]. The animals were quarantined and acclimatized in a vivarium for 14 days. Experimental groups of animals were formed by random sampling, taking into account body weight as a defining indicator. During the experiments, the general condition of the animals, the consumption of food and water was monitored daily; body weight was determined once a week. A circadian rhythm was observed.

Monitoring the state of laboratory animals was carried out daily in the morning. The number of patients and the timing of illness or death of animals, clinical symptoms of intoxication (changes in behavior, appearance, food and water consumption, reactions to external stimuli, respiratory rate, coloration of ears and limbs, the presence of facial twitching and tremors of the and coma, etc.) and irritation of the mucous membranes of the gastrointestinal tract (regurgitation, salivation, changes in the nature of feces, etc.).

All animals remained active, ate well their food rations, and gained weight; their physiological functions and behavioral responses did not change. No death of mice was noted.

Determination of the virulence of the strain (LD<sub>50</sub>). The study of toxicity was carried out on white outbred sexually mature mice of both sexes weighing 18-24 grams. The animals were randomly assigned to groups. The criterion for acceptable randomization was the absence of external signs of the disease and the homogeneity of the groups by body weight.

Experimental animals, divided into 4 groups of 12 individuals each, consisting of non-linear white mice, were injected intraperitoneally with a culture of *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 at concentrations of 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>9</sup> CFU/ml. At a concentration of 10<sup>9</sup> on the 3rd day, 1 animal fell ill, there was a decrease in appetite and mobility, loose stools, on the 5th day the animal recovered. On the 25<sup>th</sup> day, no animal deaths were noted. The animals of the control group were injected with physiological saline.

To detect the penetration of bacteria into the organs of animals from the experimental groups, a daily culture liquid of bacteria obtained by culturing the test strain in meat-peptone broth at concentrations of 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>11</sup> CFU/ml per animal was orally administered for 15 days. The animals of the control group were injected with saline [24].

### Results and discussion

A study of the acute toxicity of the *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain showed that after intraperitoneal administration of the culture at concentrations of 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> CFU/ml, all animals survived. At a concentration of 10<sup>9</sup> CFU/ml, 1 animal fell ill on day 2. When administered orally on day 2 after the introduction of the culture, 2 animals fell ill at a concentration of 10<sup>11</sup> CFU/ml, there was a decrease in appetite, mobility, and ruffled fur. On the 4<sup>th</sup> day, the animals recovered, on the 25<sup>th</sup> day, no animal deaths were noted.

Table 1 - Study of acute toxicity of the *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain with intraperitoneal and oral administration

№№	Number of animals in the experiment	Way of administration	Concentration, CFU/ml	Q-ty of sick animals	Lethality of animals	Number of surviving animals
1	12	In/peritoneally	10 <sup>3</sup>	0	0	12
2	12	In/peritoneally	10 <sup>5</sup>	0	0	12
3	12	In/peritoneally	10 <sup>7</sup>	0	0	12
4	12	In/peritoneally	10 <sup>9</sup>	1	0	12
Control	12	In/peritoneally	Saline solution	0	0	12
5	12	Per os	10 <sup>5</sup>	0	0	12
6	12	Per os	10 <sup>7</sup>	0	0	12
7	12	Per os	10 <sup>9</sup>	0	0	12
8	12	Per os	10 <sup>11</sup>	2	0	12
Control	12	Per os	Saline solution	0	0	12



Study of the allergenic effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* MB40.

The studies were carried out on 4 guinea pigs, weighing 250-350 grams, formed by a homogeneous mass (the difference is not more than 10%), behavior and condition, with clean healthy skin without mechanical damage with dilutions of cultures in concentrations of CFU/ml  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ . One day before the start of the experiment, skin "windows" (experimental and control) with an area of 6 cm<sup>2</sup> cm were cut off with scissors or an electric clipper on symmetrical areas of the lateral surfaces of the body of laboratory animals. Skin tests in experimental and control animals were placed on the same areas of the lateral surface of the body. Saline was used as a control. The reaction of the skin was taken into account using the colorimetric ruler of S.V.Suvorov after 24 hours and was evaluated in points on the following scale:

- 0 - no visible reaction;
- 1 - pale pink erythema throughout the site or along its periphery;
- 2 - bright pink erythema throughout the site or along its periphery;
- 3 - erythema red throughout the site;
- 4 - skin infiltration and edema (thickening of the skin fold) with or without erythema.

When studying the allergenic effect on guinea pigs, it was found that no visible reaction was detected.

Study of the strain for the ability to damage the conjunctival membrane of the eye.

The studies were carried out on 2 rabbits, weighing 2.5-3 kg. To test the experimental animals, 1 drop of suspension of the allergen solution, 1 ml of which contains  $10^9$  CFU/ml, was injected with an eye pipette with an elongated thin end under the upper eyelid, and 1 drop of distilled water into the second eye (control). The instillation was performed with the animal lying head down. [25]. When studying the effect of the *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain on the conjunctival membrane of the eye on the 3rd day of observation, a reaction was recorded in the form of insignificant mucous secretions from the eyes of rabbits, then the reaction completely disappeared within 7 days and then no deviations from the norm were observed [26].

The pathogenicity of the microorganism was assessed by the survival rate of infected animals, their appearance and behavior, the sowing of bacteria from the blood and organs at various times after infection, as well as the macroscopic picture of internal organs.

Based on the absence of death of animals and any pathological changes in their appearance and general behavior during the 25-day observation, negative results of microbiological analysis of the heart, lungs, liver, spleen and blood, and according to the results of studies on allergenic and local irritant effects, it was concluded that the bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 is not pathogenic, belongs to the 4th hazard class, and can be used as a basis for creating a biological product against bacterial burns of fruit crops.

**References:**

- 1 Egorova T.A., Klunova S.M. Osnovi biotekhnologii, 2006, 3: 208.
- 2 Sazykin U.O., Orehov S.N., Chakaleva I.I. Biotekhnologiya, 2006, 254.
- 3 Smirnov V.V., Reznik S.P., Vasilevskaya I.A. Spokoobrazuyushie aerobniye bakterii producenty biologicheskii aktivnykh veshestv. Naukova dumka, 1982, 280.
- 4 Şlegel G.G. Obaya mikrobiologiya. Mir, 1987, 567.
- 5 Beri D. Biologiya drojjei. Mir, 1985, 95.
- 6 Dudikova G.N. Biotekhnologicheskie osnovy ispolzovaniya laktobasill dlya zaity zernovykh p roduktov ot bakterialnoi kontaminasii. Diss. dokt. biol. nauk, 2002, 320.
- 7 Katalog kultur mikroorganizmov, 2003, 186.
- 8 Egorova N.S. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii. Moskovskii universitet, 1995, 220.

- 9 Labinskaya A.S. Mikrobiologiya s tehnikoi mikrobiologicheskikh issledovaniy. Medisina, 1978, 392.
- 10 Birger M.O. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya. Medicina, 1982, 462.
- 11 Bondarenko N.V. Sostoyanie i perspektivy razvitiya biologicheskogo metoda zaity rasteniy v SSSR. Biologiya, 1979, 6: 675.
- 12 Bagdasaryan G.A. Toksikologo gigienicheskaya osenka deystviya drojjepodobnykh gribov roda *Candida* na organizm teplokrovnykh jivotnykh i cheloveka. Toksikologicheskii vestnik, 1994, 6: 18.
- 13 Basirova P.M. Toksikologo gigienicheskaya harakteristika bakterialnogo meprina, 1989, 107.
- 14 Nemirya V.I. Rezultaty dinamicheskikh issledovaniy sostoyaniya zdorovya naseleniya v raione raspolozheniya predpriyatiya po proizvodstvu kormovogo belka. Faktory okruzhayei sredey i zdorove naseleniya, 1988, 99.
- 15 Zakharova L.B. O vliyaniy faktorov biotekhnologicheskogo proizvodstva na reaktivnost immunnoi sistemy. Medicina truda i promyslennaya ekologiya, 1994, 10: 17.
- 16 Omelyanets T.G. Gigienicheskie aspekty ohrany okruzhayei sredey v svyazi s primeneniyem v selskom hozyaystve mikrobnnykh preparatov na osnove nesporeobrazuyemykh mikroorganizmov. Avtoreferat dissertatsii, 1982, 38.
- 17 Pivovarov U.P. Promyslennyye mikroorganizmy prichiny vozmojnogo negativnogo deystviya na okruzhayau sredu i zdorove lidey. Toksikologicheskii vestnik, 1994, 6: 13.
- 18 Sergeuk N.P. Nauchnyye osnovy osenki opasnosti i gigienicheskoi reglamentatsii promyslennykh mikroorganizmov: avtoreferat dissertatsii doktora medicinskiykh nauk, 2004, 34.
- 19 Sosedova L.M. Toksiko gigienicheskaya osenka izolirovannogo i sochetannogo deystviya biologicheskogo faktora. Tezisy dokladov 2 sezda toksikologov Rossii, 2003, 244.
- 20 Izrailet L.I., Slinko V.N., Sedyseva E.P. Metodicheskie ukazaniya v postanovke issledovaniy po gigienicheskomu normirovaniyu mikrobnnykh preparatov v vozduhe rabochey zony. Latv.SSR. Riga, 1978, 3.
- 21 Molzhigitova A.E., Sadanov A.K., Ismailova E.T., Iskandarova K.A., Shemshura O.N., Seitbattaliova A.I. Antagonistic potential of epiphytic bacteria isolated in Kazakhstan against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight ICBE 20 Conference on Biodiversity and Ecosystems, 2018.
- 22 Shemshura O., Alimzhanova M., Ismailova E., Molzhigitova A., Daugaliyeva S., Sadanov A. Antagonistic activity and mechanism of a novel *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain against fire blight. Journal of Plant Pathology, 2020, 102(3): 825.
- 23 Sanitarnyye pravila po ustroystvu, oborudovani i sodержani eksperimentalno biologicheskikh klinik (vivariyev), (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom SSSR 06.04.1973 N 1045) (vmeste s "Pravilami gumannogo obraeniya s laboratornymi jivotnymi").
- 24 Ado A.D. Obshchaya allergologiya. Izd. 2, pererabotannoye i dopolnennoye. Medicina, 1978, 464.
- 25 Metodicheskie ukazaniya №2955 «Postanovka issledovaniy dlya obosnovaniya PDK proizvodstvennykh stammov i na osnove gotovykh form preparatov v vozduhe rabochey zony», 1983, 12-23
- 26 Metodicheskie ukazaniya po eksperimentalnomu obosnovani PDK mikroorganizmov-produsentov i sodержaniy ih gotovykh form v obektakh okruzhayei sredey, 1993.