



ISSN 2304-585X
ИНДЕКС 76057

2022

Microbiology and virology МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ



ВИРУСОЛОГИЯ

№4(39)

**«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы»
Жауапкершілігі шектеулі серіктестігі**

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

**Товарищество с ограниченной ответственностью
«Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»**

№ 4(39)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

**АЛМАТЫ
2022**

ISSN 2304-585 X
МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ
 № 4(39)/2022

Научно-практический журнал

Журнал зарегистрирован в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан. Свидетельство о регистрации №12821-Ж от 12.06.2012 г.

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ

© ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

Редакционная коллегия

Саданов А.К. – доктор биологических наук, профессор, академик (главный редактор)

Айткельдиева С.А. – доктор биологических наук (заместитель главного редактора)

Балгимбаева А.С. – кандидат биологических наук (ответственный секретарь)

Dr. Azliati Azizan (USA) – PhD

Березин В.Э. – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент НАН РК

Богоявленский А.П. – доктор биологических наук, профессор

Гаврилова Н.Н. – доктор биологических наук, профессор
 Головлева Л.А. (Россия) – доктор биологических наук, профессор

Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук

Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук
 Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана

Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор
 Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент

Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор
 Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD

Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор
 Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125
 Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68

Территория распространения –
 Республика Казахстан

Периодичность – 4 номера в год
 Тираж 500 экземпляров

Адрес РЕДАКЦИИ 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105, тел.+7(727) 291-84-97, 291-97-36

Сайт: <http://imv-journal.kz>

Подписной индекс - 76057

ПЕЧАТЬ

ТОО «Print Market.kz»

Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125

Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68

Территория распространения –

Республика Казахстан

Периодичность – 4 номера в год

Тираж 500 экземпляров

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Г.В. Лукманова, Н.Г. Кливлеева, Т.И. Глебова,
 А.А. Айтжанова, Н.С. Онгарбаева, М.Г. Шаменова,
 Д.А. Исмагулова, Е.И. Исаева
 Устойчивость вирусов гриппа к этиотропным препаратам6

Е.А. Олейникова, А.В. Чижаева, М.Б. Алимжанова,
 А.А. Амангелді, М.Г. Саубенова, А.Ж. Алыбаева,
 Н.В. Клипина, Ж.Н. Ермекбай, Д.Д. Бокенов
 Последние направления развития исследований в области хлебопечения19

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

К.О. Карамендин, А.И. Кыдырманов, А.А. Абишов,
 Ж.Ж. Кумекбаева, М.Н. Ахметжанова
 Герпесвирусы лошадей EHV-1 и EHV-4 в Казахстане.....31

Ж.Н. Ермекбай, Е.А. Олейникова, С.Т. Даугалиева,
 Д.Д. Бокенов, М.Г. Саубенова, А.Б. Алтекей,
 А.А. Айтжанова
 Выделение микромицетов - засорителей лигноцеллюлозных отходов злаковых культур45

З.А. Кожаметова, К.А. Мырзабек, К. Серикбай,
 М. Абдуллаева
 Особенности морфологических, культуральных, физиологических и биохимических свойств дрожжей выделенных из вина изготовленного южном регионе Казахстана70

А.Р. Әбдімұхтар, Г.Д. Наханова, Ж.К. Кошембетов,
 Б.К. Умиралиев, Н.К. Оразымбетова, Ш.С. Тұрыскелді,
 С.Ш. Нурабаев
 Выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных75

Ж.Н. Ермекбай, Е.А. Олейникова, М.Г. Саубенова,
 С.Т. Даугалиева, А.В. Кердяшкин, М.Е. Елубаева,
 Г.В. Кердяшкина
 Влияние эндофитных микроорганизмов на устойчивость пшеницы к засолению.....88

А.Ж. Измұқан, А.С. Кистаубаева, А.С. Машжан,
 Н. Биркеланд, И.С. Савицкая
 Исследование продуцентов термозимов, выделенных из Жаркентского геотермального источника.....104

Г.Т. Джакибаева, А.И. Байдалинов, О.Н. Шемшура,
 Э.О. Измайлова, Г.Б. Баймаханова
 Активность коллекционных молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий, входящих в консорциум123

Э.Р. Файзулина, Л. Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова,
Г.Б. Баймаханова, С.А. Айткельдиева, И. Э. Смирнова,
З. Алексиева

Влияние солёности и pH среды на деградацию нефти
консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих
микроорганизмов.....131

Г.К. Абитаева, З.С. Сармурзина, Г.Н. Бисенова,
Б.К. Мусабаева, Т.Ч. Тултабаева

Характеристика штаммов пробиотиков для разработки
напитков профилактического назначения142

МАЗМҰНЫ

CONTENTS

ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

Г.В. Лукманова, Н.Г. Кливлеева, Т.И. Глебова,
А.А. Айтжанова, Н.С. Онгарбаева, М.Г. Шаменова,
Д.А. Исмагулова, Е.И. Исаева
Тұмау вирустарының этиотропты препараттарға
төзімділігі.....12

Е.А. Олейникова, А.В. Чижаева, М.Б. Алимжанова,
А.А. Амангелді, М.Г. Саубенова, А.Ж. Алыбаева,
Н.В. Клипина, Ж.Н. Ермекбай, Д.Д. Бокенов
Най пісіру саласындағы зерттеулердің дамуының соңғы
бағыттары.....25

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

К.О. Қарамендин, А.И. Қыдырманов, А.А. Әбішев,
Ж.Ж. Көмекбаева, М.Н. Ахметжанова
Қазақстандағы EHV-1 және EHV-4 жылқылар
герпесвирустары.....37

Ж.Н. Ермекбай, Е.А. Олейникова, С.Т. Даугалиева,
Д.Д. Бокенов, М.Г. Саубенова, А.Б. Алтекей,
А.А. Айтжанова
Дәнді дақылдардың лигноцеллюлоза қалдықтарынан
ластушы-микромикеттерін бөліп алу.....55

З.Ә. Қожахметова, К.А. Мырзабек, Қ. Серікбай,
М. Абдуллаева
Қазақстанның оңтүстік өңірінде дайындалған шараптан
бөлініп алынған ашытқылардың морфологиялық,
культуральдық, физиологиялық және биохимиялық
қасиеттерінің ерекшеліктері65

А.Р. Әбдімұхтар, Г.Д. Наханова, Ж.К. Кошеметов,
Б.К. Умиралиев, Н.К. Оразымбетова, Ш.С. Тұрыскелді,
С.Ш. Нурабаев
Ет коректілер обасы вирусын өсірудің оңтайлы жүйесін
таңдау.....80

Ж.Н. Ермекбай, Е.А. Олейникова, М.Г. Саубенова,
С.Т. Даугалиева, А.В. Кердышкин, М.Е. Елубаева,
Г.В. Кердышкина
Эндифитті микроорганизмдердің бидайдың тұздану
төзімділігіне әсері95

А.Ж.Ізмұқан, А.С. Кистаубаева, А.С. Машжан,
Н. Биркеланд, И.С. Савицкая
Жаркент геотермалдық суынан бөлінген термозимдер-
продуценттерін зерттеу110

Г.Т. Джакибаева, А.И. Байдалинов, О.Н. Шемшұра,
Э.О. Измайлова, Г.Б. Баймаханова
Консорциумға кіретін коллекциялық сүт қышқылы
бактерияларының және лактозаны ашытатын
ашытқылар мен сүт қышқылы бактерияларының
белсенділігі117

REVIEW RESEARCH PAPERS

G.V. Lukmanova, N.G. Klivleyeva, T.I. Glebova,
A.A. Aitzhanova, N.S. Ongarbayeva, M.G. Shamenova,
D.A. Ismagulova, E.I. Isaeva
Resistance of influenza viruses to etiotropic drugs.13

Ye.A. Oleinikova, A.V. Chizhayeva, M.B. Alimzhanova,
A.A. Amangeldi, M.G. Saubenova, A.Zh. Alybayeva,
Klipina N.V., Zh. N. Yermekbay, D.D. Bokenov
Latest directions of development of research in the field of
bakery.....25

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

K.O. Karamendin, A.I. Kydyrmanov, A.A. Abishov,
Zh. Zh. Kumekbayeva, M.N. Akhmetzhanova
Equine herpesviruses EHV-1 and EHV-4 in Kazakhstan.....38

Zh.N. Yermekbay, Ye.A. Oleinikova, S.T. Daugaliyeva,
D.D. Bokenov, M.G. Saubenova, A.B. Altekey, A.A. Aitzhanova
Isolation of spoiling micromycetes in lignocellulosic residues of
cereal crops.....56

Z.A. Kozhakhmetova, K.A. Myrzabek, K. Serikbay,
M. Abdullaeva
Features of morphological cultural physiological and biochemical
properties of yeast isolated from wine produced in the southern
region of Kazakhstan70

A.R. Abdimukhtar, G.D. Nahanova, Zh.K. Koshemetov,
B.K. Umiraliyev, N.K. Orazymbetova, Sh.S. Turyskeldi,
S.Sh. Nurabaev
Selection of the optimal system of cultivation of carnivorous
dispest virus.....81

Zh.N. Yermekbay, Ye.A. Oleinikova, M.G. Saubenova,
S.T. Daugaliyeva, A.V. Kerdyashkin, M.Y. Yelubaeva,
G.V. Kerdyashkina
Influence of endophytic microorganisms on wheat resistance to
salinity..... 96

A.Zh. Izmukan, A.S. Kistaubayeva, A.S. Mashzhan,
N. Birkeland, I.S. Savitskaya
The study of thermozyme-producers isolated from Zharkent
geothermal hot spring110

G.T. Dzhakibayeva, A.I. Baydalinov, O.N. Shemshura,
E.O. Izmailova, G.B. Baumahanova
Activity of collection lactic acid bacteria and lactose-fermenting
yeast and lactic acid bacteria included in the
consortium.....124

Э.Р. Файзулина, Л. Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова,
Г.Б. Баймаханова, С.А. Айткельдиева, И. Э. Смирнова,
З. Алексеева

Термотолерантты мұнайотықтырғыш
микроорганизмдер консорциумдарының мұнайды
ыдыратуына ортаның тұздылығы мен рН
әсері.....136

E.R. Faizulina, L.G. Tatarkina, G.A. Spankulova,
G.B. Baimakhanova, S.A. Aitkeldiyeva, I.E. Smirnova,
Z. Alekseeva

Influence of salinity and ph of the medium on oil degradation by
consortia of thermotolerant oil-oxidizing
microorganisms.....137

Г.К. Абитаева, З.С. Сармурзина, Г.Н. Бисенова,
Б.К. Мусабаева, Т.Ч. Тултабаева

Профилактикалық мақсаттағы сусындарды әзірлеуге
арналған пробиотикалық штаммдардың сипаттамасы
.....150

G.K. Abitayeva, Z.S. Sarmurzina, G.N. Bissenova,
B.K. Mussabayeva, T.Ch. Tultabayeva

Characteristics of probiotic strains for the development of
preventive drinks151

=====

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

=====

МРНТИ: 34.25;76.31

Г.В. ЛУКМАНОВА¹, Н.Г. КЛИВЛЕЕВА¹, Т.И. ГЛЕБОВА¹, А.А. АЙТЖАНОВА^{1*},
Н.С. ОНГАРБАЕВА¹, М.Г. ШАМЕНОВА¹, Д.А. ИСМАГУЛОВА¹, Е.И. ИСАЕВА²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.
почетного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

*e-mail: aida_91_20@mail.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА К ЭТИОТРОПНЫМ ПРЕПАРАТАМ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.01

Аннотация

Респираторные вирусные инфекции, являясь наиболее распространенными среди всех заболеваний человека, наносят огромный ущерб здоровью людей и экономике. Социркуляция разных вирусов и вариативность их соотношения от сезона к сезону осложняет подбор средств для профилактики и лечения. Кроме того, часто имеет место инфицирование вирусами с устойчивостью к специфическим препаратам. Проблема резистентности инфекционных агентов к лекарственным средствам на сегодняшний день является одной из главных задач, стоящих перед биологическими и медицинскими науками. Лекарственная устойчивость вирусов является результатом изменений их наследственных свойств и нередко связана с избыточным использованием препаратов. Вероятность появления устойчивых к препаратам штаммов вирусов нарастает с увеличением продолжительности лечения в клинической практике. Наряду с этим, более 30% резистентных штаммов обнаруживается у больных, никогда не принимавших этиотропные препараты. Поэтому важно выявить соотношение чувствительных и устойчивых штаммов в популяции, изучить механизмы возникновения устойчивости и возможные способы её преодоления. Вирусы гриппа, изолированные в Казахстане с 2015 г., проявляют чувствительность к препаратам на основе озельтамивира и широкий спектр восприимчивости к препаратам адамантанового ряда. Изучение чувствительности аборигенных вирусов к противовирусным препаратам предоставляет информацию для формирования рекомендаций по использованию лекарственных средств для лечения и профилактики гриппозной инфекции у населения. Рациональное использование и подбор лекарственных средств может позволить снизить экономические потери, связанные с временной нетрудоспособностью части населения в эпидемический период.

Ключевые слова: лекарственная резистентность, респираторные вирусы, противовирусные препараты.

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), к числу которых относятся грипп и коронавирус, являются самыми массовыми повторяющимися инфекциями человечества и представляют серьезную проблему для общественного здравоохранения. По социальной значимости, огромному ущербу наносимому здоровью населения и экономике, ОРВИ находятся на первом месте среди всех заболеваний человека [1, 2]. На долю сезонных ОРВИ приходится 10–30% временной нетрудоспособности населения. Обычно ОРВИ составляют до 40% всех заболеваний взрослых, более 80% всей инфекционной патологии, более 60% заболеваний среди детей. Ежегодно сезонные эпидемии приводят примерно к 3–5 миллионам случаев тяжелой болезни и примерно к 250–500 тысячам случаев смерти [3]. В результате последней пандемии 2019–2022 гг., вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, заболели более 638 млн. человек, умерли 6,62 млн. [4].

В результате массовых противоэпидемических мероприятий в последние три года снизилась заболеваемость гриппом и другими ОРВИ, но тем не менее никогда не падала до нуля. В последнее время наблюдается социркуляция разных респираторных вирусов и этиологическая расшифровка эпидемического процесса варьирует из года в год [5], что осложняет эпидемическую ситуацию и, соответственно, подбор средств для профилактики и лечения [6, 7, 8]. Особую сложность создает факт быстрой адаптации вирусов к используемым химиопрепаратам с формированием частичной или полной резистентности.

Эффективная стратегия по борьбе с респираторными вирусами предполагает применение этиотропных химиопрепаратов, оказывающих непосредственное воздействие на специфическую мишень – вирусный белок, участвующий в цикле репликации [9, 10].

Наиболее распространенные на сегодняшний день на отечественном рынке этиотропные препараты против гриппа представлены четырьмя группами:

- блокаторы ионного канала (адамантаны, ремантадин);
- специфический шаперон гемагглютиниона (НА) (арбидол);
- ингибиторы нейраминидазы (НА) (тамифлю (озельтамивир), реленза, перамивир);
- ингибиторы NP-белка (ингавирин).

Этиотропные химиопрепараты против коронавируса в настоящий момент находятся на стадии разработки и испытаний [11], лечение осуществляется в основном симптоматическое и предотвращающее осложнения [12]. Рекомендованный в 2020 г. для лечения COVID-19 в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U.S. Food and Drug Administration) [13] препарат «Ремдесивир», ингибирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса [14, 15], вызывает еще множество сомнений и не рекомендован ВОЗ [16].

Проблема терапии респираторных вирусных инфекций на сегодняшний день далека от решения, поскольку часто имеет место инфицирование вирусами с устойчивостью к специфическим препаратам. Лекарственная устойчивость является результатом изменений наследственных свойств вирусов и развивается при многократном применении препаратов [17, 18]. Резистентность обусловлена мутациями в том вирусном белке, который является мишенью действия для препарата [19, 20].

Так, ВГ А(H1N1)pdm09, вызвавший первую пандемию XXI века, изначально оказался резистентным к препаратам адамантанового ряда, но чувствительным к ингибиторам НА вирусов гриппа. Однако активное использование озельтамивира привело к появлению уже в апреле 2009 г. нескольких резистентных мутантов в популяции нового пандемического штамма. Это определило актуальность расширения мониторинга возникновения устойчивых вариантов при дальнейшем широком применении препарата, особенно при лечении легких форм и профилактике заболевания. Устойчивость к озельтамивиру в 63% случаев связана с терапевтическим и профилактическим использованием препарата, 37% резистентных штамма обнаружены у пациентов, которые ранее не принимали специфические противовирусные препараты, что можно объяснить передачей устойчивых штаммов от человека к человеку [21].

Резистентность ВГ к препаратам адамантанового ряда достигает 90% в некоторых странах, например, в США [22] обусловлена мутациями в положениях 26, 27, 30, 34 М2 белка [23]. Установлено, что замены V28L и S31N в структуре этого белка современных пандемических вирусов строго ассоциированы с резистентностью к противовирусным препаратам адамантанового ряда [24, 25].

Проблема химиорезистентности касается и НА-ингибиторов [26]. С 1999 г., когда они появились на рынке, и вплоть до начала сезона 2007–2008 гг. подавляющее большинство циркулирующих вирусов гриппа сохраняло чувствительность к этим препаратам, а резистентные штаммы встречались не более чем в 6% случаев. Однако в течение следующих 1–2 лет доля устойчивых возбудителей резко возросла [27]. Так, в Японии она к 2008–2009 гг. увеличилась практически до 100%. В сезоне 2012–2013 гг., неоднократно

появлялись сообщения о выявлении у больных штаммов А (H1N1)pdm09, устойчивых к озельтамивиру [28]. В ряде случаев устойчивые штаммы выявлялись у лиц, не подвергавшихся лечению NA-ингибиторами, что является доказательством циркуляции резистентных штаммов среди населения.

Резистентность к препаратам специфического действия обусловлена мутациями в генах, кодирующих их белки-мишени. К настоящему времени учеными во всем мире выявлен ряд таких мутаций в геноме ВГ. Так, устойчивость к тамифлю среди штаммов А/H1N1 и А/H2N2 выявлена за счет активного сайта R292K и E119G NA [29]. Замена H275Y в поверхностном гликопротеиде NA вируса гриппа отвечает за устойчивость к озельтамивиру [30]. В Нидерландах был изолирован пандемический штамм вируса гриппа А(H1N1)pdm09 с мутацией I223R в NA, вызвавшей снижение чувствительности ко всем существующим ингибиторам NA вирусов гриппа. Сообщалось о штаммах А(H1N1)pdm09, выявленных в Сингапуре и Австралии в 10 и 30% случаев соответственно, с мутацией S247N в белке NA, которая привела к снижению чувствительности вирусов к озельтамивиру и занамивиру [31]. Устойчивые к озельтамивиру вирусы А(H1N1)pdm09 с H275Y-мутацией были изолированы от пациентов в Южной Корее [32–35]. Было высказано предположение о существовании двух сопутствующих H275Y-мутации замен в белке NA сезонных штаммов А(H1N1) — V234M и R222Q, поддерживающих вирусную жизнеспособность и обеспечивающих стабильную работу NA. Изучение на модели хорька пары устойчивого и чувствительного к озельтамивиру штаммов ВГ А(H1N1) pdm09 показало различие в 275-м положении белка NA [36]. Первый случай изоляции резистентного к этому препарату штамма ВГ типа В с мутацией R152K в NA описан в 1998 г. [37]. В 2007—2008 гг. в Мьянме были обнаружены ВГ А(H3N2) (< 1,5% изученных случаев) с мутациями Q136K и S31N в белках NA и M2 соответственно, которые обладали пониженной чувствительностью как к занамивиру, так и к ремантадину [38].

Молекулярно-эпидемиологические данные многих исследований подтверждают, что H275Y-мутация часто бывает вызвана селективным отбором под воздействием специфического лечения [39]. Также в Южной Корее в NA вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированного от пациента, принимавшего озельтамивир и перамивир, была обнаружена I117M-мутация, которая может быть связана с пониженной чувствительностью к озельтамивиру [40].

Формирование устойчивости ВГ к препаратам приводит к проблеме, когда набор существующих противовирусных средств оказывается малоэффективным. Вследствие этого в клинической практике увеличивается продолжительность лечения, что, в свою очередь, способствует селекции устойчивых к препаратам штаммов и вероятность их появления нарастает. Поэтому крайне важно иметь не только как можно более широкий спектр противогриппозных препаратов с различным механизмом действия, но также понять механизмы возникновения устойчивости и возможные способы ее преодоления.

Работы по изучению устойчивости ВГ к химиопрепаратам и причин ее формирования ведутся во многих исследовательских центрах во всем мире. В связи с высокой мутационной изменчивостью ВГ, циркулирующие в различных регионах и в разное время, могут существенно различаться. Поэтому рекомендации по профилактике, лечению и вакцинации, разработанные за рубежом, часто оказываются неактуальными для отечественного здравоохранения.

Полученные данные могут способствовать раннему выявлению опасных, устойчивых к лечению штаммов и своевременной организации противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение распространения инфекции. Выявление маркеров резистентности к химиопрепаратам позволяет ускорить процесс определения устойчивости вновь появляющихся штаммов вируса и уточнить стратегию лечения и профилактики гриппа среди населения Республики.

В Казахстане также ведутся работы, цель которых — изучение проблемы формирования лекарственно-устойчивых форм вирусов, а также поиск путей преодоления

резистентности. Выполнены эксперименты по адаптации эталонных штаммов ВГ A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и A/Swine/Iowa/30 (H1N1) к высоким концентрациям противовирусных препаратов тамифлю и ремантадин. Показано, что референсные штаммы ВГ A/H1N7 и A/H7N7 обладают определенной чувствительностью к вышеуказанным этиотропным химиопрепаратам, получены адаптированные к данным лекарственным средствам мутантные варианты этих штаммов с измененными биологическими свойствами основных поверхностных белков. Анализ данных секвенирования подтвердил корреляцию между изменением фенотипических проявлений белков гемагглютинина и NA и модификацией генетического аппарата. Выявлена замена в молекуле белка M1 в положении 207, принимающая участие в формировании устойчивости к препарату тамифлю, ранее не указанная в литературе. Сделано предположение о мультигенном характере возникновения резистентности к тамифлю [41].

Данные по чувствительности эталонных вирусов в отношении лекарственных препаратов послужили основанием для проведения подобного рода исследований на казахстанских штаммах вируса гриппа [42].

Изучение чувствительности к химиопрепаратам показало гетерогенность популяции казахстанских вирусов гриппа по этому признаку. Так, репродукция всех изученных вирусов ингибировалась препаратом Тамифлю в разной степени эффективности: Ингибирующая концентрация ($ИК_{50}$) варьировала в широком диапазоне значений: от $0,60 \pm 0,3$ до $25,38 \pm 1,5$ мг/мл. По отношению к ремантадину вирусы в целом проявили меньшую степень чувствительности: репродукция 73,91% изолятов с антигенной формулой A/H1N1 ингибировалась препаратом в различных дозах ($ИК_{50}$ составила $3,49 \pm 0,3 - 25,50 \pm 3,0$ мг/мл), 26,09% изолятов оказались к данному препарату полностью резистентными. К арбидолу и ингавирину все исследуемые вирусы проявили резистентность [43, 44]. Молекулярно-биологический анализ аборигенных штаммов ВГ показал, отсутствие молекулярных детерминант устойчивости у всех исследуемых изолятов к препаратам адамантанового ряда и к препаратам на основе озельтамивира (Тамифлю) [45, 46, 47].

Изучение молекулярных и генетических характеристик штаммов является основным звеном как системы мониторинга эволюционных изменений в геноме вируса, так и чувствительности к противовирусным лекарственным средствам. Мутации, являющиеся маркерами устойчивости к противовирусным препаратам, представляют интерес с точки зрения генетического признака, позволяющего идентифицировать резистентный штамм. Кроме того, они являются новой генетической особенностью, способной влиять на вирулентные и репродуктивные свойства вируса. Изучение устойчивости респираторных вирусов к химиопрепаратам способствует разработке эффективной тактики борьбы, как с эталонными, так и новыми аборигенными штаммами. Также это позволяет выявить новые, генетически измененные варианты вирусов, потенциально опасные для человека, провести коррекцию способов лечения и профилактики гриппа, что очень важно для практической эпидемиологии.

Финансирование: Работа выполнена в рамках Научно-технической программы Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан: BR10965178 «Разработка оригинальных отечественных препаратов с противовирусной активностью, эффективных в отношении COVID-19 и гриппа».

Литература:

1 Seto W.H., Conly J.M., Pessoa-Silva C.L. et al. Infection prevention and control measures for acute respiratory infections in healthcare settings: an update East Mediterr Health J. 2013; 19 (Suppl. 1): S39–47.

2 <https://www.who.int/ru>

3 Зайцева О.В. Современные возможности профилактики и лечения острых респираторных заболеваний. РМЖ 2011;23:1458. http://www.rmj.ru/articles/bolezni_dykhatelnykh_putey/Sovremennyye_vozmoghnosti_profilaktiki_i_lecheniya_ostryh_respiratornykh_zabolevaniy/#ixzz4TX3fqhGc

4 https://www.google.com/search?q=%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0+%D0%BF%D0%BE+%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%83+%D0%B2+%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B5&bih=871&biw=1280&hl=ru&ei=LgV3Y6vFB4aDxc8P66eisAI&oq=%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0+%D0%BF%D0%BE+&gs_lcp=Cgxn3Mtd2l6LXNlcnAQAQgEMgUIABCABDIFCAAQgAQyBQgAEIAEMggIAB CABBDJAzIFCAAQgAQyBQgAEIAEMgUIABCABDIFCAAQgAQyBQgAEIAEMgUIABCABDolCAAQgAQQsAM6CAgAELEDEIMBOggIABCABBCxAzoLCAAQgAQQsQMqgwE6EQguEIAEELED EIMBEMcBENEDOGgILhCxAxCDAToLCC4QgAQQsQMqgwE6CwguEIAEELEDENQCOgQIABAD OgsILhCABBDHARCvAUoECEYYAUoECEYYAFCZB1iuL2C7TGgBcAB4AIABlwGIAAkNkgEEMC 4xNJgBAKABAcgBACABAQ&sclient=gws-wiz-serp Дата обращения – 22.11.2022.

5 Киселев О.И. Основные генетические факторы патогенности вирусов гриппа типа А и место пандемического вируса среди патогенных штаммов В: под ред. О.И. Киселева Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1v-2009. СПб.-М.: Компания «Димитрейд График Групп®», 2011:121-123.

6 Кливлеева Н.Г., Лукманова Г.В., Глебова Т.И. Противовирусные препараты для профилактики и лечения гриппа и ОРВИ. В: «Вопросы современной науки»: коллект. науч. монография; [под ред. Н.Р. Красовской]. Т. 52. М.: Интернаука, 2020:7-31. <https://www.internauka.org/monograph/modern-science/52>.

7 Иванова В.Т., Матюшина Р.О., Слепушкин А.Н. и др. Эпидемические штаммы вирусов гриппа А и В в сезоне 2005-2006 гг. в России. В: Вирол. 2008;4:13-18.

8 Киселев О.И., Ершов Ф.И., Быков А.Т., Покровский В.И. Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения СПб., 2010:97.

9 FDA. Antiviral Drug Advisory Committee. Gaithersburg: Centre for Drug Evaluation and Research 2002: 1–266.

10 Шульдяков А.А., Кузнецов В.И., Ляпина Е.П. Современные подходы к химиотерапии ОРВИ и гриппа - некоторые аспекты проблемы Трудный пациент 2010;8(12):4-7. <http://medi.ru/doc/310216.htm>

11 Berezin V, Bogoyavlenskiy A, Alexyuk M, Alexyuk P. Plant Metabolites as Antiviral Preparations Against Coronaviruses. J. Med Food 2021;10:1028-1038. doi: 10.1089/jmf.2020.0190

12 Клинический протокол диагностики и лечения: коронавирусная инфекция Covid-19 у взрослых. Одобрен Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг МЗ РК от 25.07.2022 (Протокол №166) Доступен: <https://diseases.medelement.com/disease/%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BD%D0%B0%D1%8F-%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F-c%D0%BEvid-19-%D1%83-%D0%B2%D0%B7%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D1%8B%D1%85-6-%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%BA%D0%BF-%D1%80%D0%BA-2022/17238> (дата обращения: 13.10.2022)

13 FDA Allows For 'Emergency Use' of Remdesivir, Experimental Coronavirus Drug. Time. Associated Press (1 мая 2020). Дата обращения: 2 мая 2020.

14 Gordon C. J., Tchesnokov E. P., Feng J. Y., Porter D. P., Götte M. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. The Journal Of Biological Chemistry 2020; 10 April; 295(15): 4773—4779. doi:10.1074/jbc.AC120.013056. PMID 32094225.

15 Gordon C. J., Tchesnokov E. P., Woolner E., Perry J. K., Feng J. Y., Porter D. P., Götte M. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. The Journal Of Biological Chemistry 2020; 15 May; 295(20): 6785—6797. doi:10.1074/jbc.RA120.013679 PMID 32284326.

16 WHO recommends against the use of remdesivir in COVID-19 patients. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-recommends-against-the-use-of-remdesivir-in-covid-19-patients> Дата обращения: 13.10.2022.

17 Железникова Г. Ф., Иванова В. В., Монахова Н. Е. Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей. СПб: Фолиант, 2007:254.

- 18 Beigel J., Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral. Research.* 2008; 78: 91-102.
- 19 Романцов М.Г., Киселев О.И., Сологуб Т.В. Этиопатогенетическая фармакотерапия ОРВИ и гриппа. <http://www.lvrach.ru/2011/02/15435132/>
- 20 Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Коваленко А.Л. Противовирусные препараты для лечения ОРВИ и гриппа у детей (клинический обзор) *Фундаментальные исследования* 2010;9:76-87. URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=13379> (дата обращения: 14.10.2016).
- 21 Федякина И.Т., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. и др. Изучение чувствительности пандемических вирусов гриппа А 2009 H1N1 и высоковирулентных вирусов гриппа птиц А(H5N1) к противогриппозным химиопрепаратам. *Антибиотики и химиотерапия* 2011;56:3-4.
- 22 Ленева И.А. Пандемический вирус гриппа 2009 H1N1 и современные противогриппозные препараты. *РМЖ* 2010;9:597 http://www.rmj.ru/articles/infektsiya/Pandemicheskiy_virus_grippa_2009_H1N1_i_sovremennye_protivogrippoznye_preparaty/#ixzz4NJyqR2x9
- 23 Monto A. Viral susceptibility and the choice of influenza antivirals. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 47:346–348.
- 24 Barik S. New treatments for influenza. *BMC Med.* 2012;10:104. doi: 10.1186/1741–7015–10–104.
- 25 Garten R.J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009;325:197–201.
- 26 Цветков В.В., Деева Э.Г., Даниленко Д.М., и др. Молекулярно-генетические факторы патогенности вируса гриппа А(H1N1)pdm09. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2014;19(4):4-11.
- 27 Dixit R., Khandaker G., Ilgoutz S. Emergence of oseltamivir resistance. *Infectious Disorders — Drug Targets.* 2013; 13 (1): 35–45.
- 28 Устойчивость к противомикробным препаратам Информационный бюллетень №194 Апрель 2015 г. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/ru/>
- 29 http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/
- 30 Brookes D.W., Miah Sh., Lackenby A., Hartgroves L., Barclay W.S., Pandemic H1N1 2009 influenza virus with the H275Y oseltamivir resistance neuraminidase mutation shows a small compromise in enzyme activity and viral fitness, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* March 2011, Vol. 66, Issue 3: 466–470. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq486>
- 31 Weekly Epidemiol. Rec. 2011; 45: 497—508. <http://www.who.int/wer>, WHO. Influenza A(H1N1) Virus Resistance to Oseltamivir: 2008 Southern Hemisphere Influenza Season. http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summarysouth2008/en/index.html.-2008.
- 32 Calatayud L., Lackenby A., Reynolds A. et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infection in England and Scotland, 2009—2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 1807—1815.
- 33 Shin S.Y., Kang C., Gwack J. et al. Drug-resistant pandemic (H1N1) 2009, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 702—704.
- 34 Sleeman K., Sheu T.G., Moore Z. et al. Influenza B viruses with mutation in the neuraminidase active site, North Carolina, USA, 2010—2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 2043—2046.
- 35 Ujike M., Ejima M., Anraku A. et al. Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009—2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 470—479. *Weekly Epidemiol. Rec.* 2011; 45: 497—508. <http://www.who.int/wer>.
- 36 Duan S., Boltz D.A., Seiler P. et al. Oseltamivir-resistant pandemic H1N1/2009 influenza virus possesses lower transmissibility and fitness in ferrets. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (7): e1001022.
- 37 Gubareva L.V., Matrosovich M.N., Brenner M.K. et al. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *Emerg. Infect. Dis.* 1998;178:1257—1262.
- 38 Бреслав Н.В., Шевченко Е.С., Абрамов Д.Д. и др. Эффективность применения антинейраминидазных химиопрепаратов во время пандемии гриппа и в постпандемический период. *Вопросы вирусологии* 2013;58(1):28-32.
- 39 Dapat C., Suzuki Y., Saito R. et al. Rare influenza A (H3N2) variants with reduced sensitivity to antiviral drugs. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16:493-496.
- 40 Yi H., Lee J.Y., Hong E.H. et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16:1938-1942.
- 41 Коротецкий И.С., Зубенко Н.В., Швидко С.В. и др. Анализ структурных изменений генов вируса гриппа А, ответственных за формирование фенотипа устойчивости к лекарственным

препаратам. В: Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию: матер. междунар. науч. конф. Алматы, 2016:284-285.

42 Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Baimukhametova A.M. 2018–2019 antiviral drug sensitivity of the influenza virus strains isolated from various regions of Kazakhstan. Russian Journal of Infection and Immunity. 2021;11(6):1159-1166. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ADS-1497>

43 Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Лукманова Г.В. и др. Характеристика вирусов гриппа А(H1N1), выделенных в Аральском регионе Республики Казахстан в 2015 г. В: Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию: матер. междунар. науч. конф. Алматы, 2016:313-317.

44 Lukmanova, G.V., Klivleyeva, N.G., Glebova, T.I., Sayatov, M.H., Ongarbayeva, N.S., Saktaganov, N.T., Shamenova, M.G., Kalkozhayeva, M.K., Baiseit, S.B., Baimukhametova, A.M., Amirasheva, L.K., Webby, R.J. Sensitivity of 2015 Kazakhstan influenza viruses to chemotherapy drugs. Bulletin of the national academy of sciences of the republic of Kazakhstan 2018;4:18-22. <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000450771300003>

45 Lukmanova G., Klivleyeva N., Glebova T., Saktaganov N., Ongarbayeva N., Baimukhametova A. Study of the 2019 A/H1N1 influenza virus susceptibility to chemotherapy drugs in ovo. Biotechnology & Biotechnological Equipment. Issue sup1: Special Issue: European Biotechnology Congress 2020. Poster Abstracts 2021;35:S62-128. Published online: 26 Feb 2021. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2020.1871545>

46 Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Ongarbayeva N.S. Sensitivity of influenza virus strains isolated from various regions of Kazakhstan in 2018–2019 to antiviral drugs. Clinical Medicine (Russian Journal). 2021;99(4):276-281. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2021-99-4-276-281>

47 Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Korotetskiy I., Glebova T., Saktaganov N., Shamenova M., Baimakhanova B., Shevtsov A., Amirgazin A., Berezin V., Webby R. Complete Genome Sequence of Swine Influenza Virus Isolate A/swine/Karaganda/04/2020 (H1N1) from Kazakhstan. Microbiology Resource Announcements 2021;10(39):e00786 10:e00786-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00786-21>

Г.В. ЛУКМАНОВА¹, Н.Г. КЛИВЛЕЕВА¹, Т.И. ГЛЕБОВА¹, А.А. АЙТЖАНОВА^{1*},
Н.С. ОНГАРБАЕВА¹, М.Г. ШАМЕНОВА¹, Д.А. ИСМАГУЛОВА¹, Е.И. ИСАЕВА²

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Академик Н.Ф. Гамалей атындағы эпидемиология және микробиология федералды
ғылыми-зерттеу орталығы, Мәскеу, Ресей

*e-mail: aida_91_20@mail.ru

ТҰМАУ ВИРУСТАРЫНЫҢ ЭТИОТРОПТЫ ПРЕПАРАТТАРҒА ТӨЗІМДІЛІГІ

Түйін

Респираторлық вирустық инфекциялар барлық аурулары арасында жиі кездеседі, адамдардың денсаулығы мен экономикасына үлкен зиян келтіретін аурулар қатарына жатады. Әр түрлі вирустардың айналымы және олардың маусымнан маусымға қатынасының өзгергіштігіне байланысты алдын-алу және емдеу шараларын таңдауды қиындатады. Сонымен қатар, белгілі бір препараттарға төзімді вирустар инфекциясы жиі кездеседі. Инфекциялық қоздырғыштардың дәрілік заттарға төзімділік мәселесі бүгінгі күні биология және медицина ғылымдарының алдында тұрған негізгі мәселелердің бірі болып табылады. Вирустардың дәріге төзімділігі олардың тұқым қуалайтын қасиеттерінің өзгеруінің нәтижесі болып табылады және көбінесе препаратты шамадан тыс қолданумен байланысты. Дәріге төзімді штаммдардың пайда болу ықтималдығы клиникалық тәжірибеде емдеу ұзақтығымен байланысты. Сонымен қатар, төзімді штаммдардың 30%-дан астамы этиотропты препараттарды ешқашан қабылдамаған науқастарда кездеседі. Сондықтан популяциядағы сезімтал және төзімді штаммдардың арақатынасын анықтау және төзімділіктің пайда болу механизмдерін және оны жеңудің мүмкін жолдарын түсіну маңызды. Қазақстанда 2015 жылдан бері оқшауланған тұмау вирустары оселтамивир негізіндегі препараттарға және адамнан препараттарға кең ауқымды сезімталдықты көрсетеді. Қоздырғыштардың вирусқа қарсы

препараттарға сезімталдығын зерттеу халық арасында тұмау инфекциясын емдеу және алдын алу үшін препараттарды қолдану бойынша ұсыныстарды қалыптастыру үшін ақпарат береді. Дәрілік заттарды ұтымды пайдалану және таңдау эпидемия кезеңінде халықтың бір бөлігінің уақытша еңбекке жарамсыздығына байланысты экономикалық шығындарды азайтуға мүмкіндік береді.

Кілтті сөздер: дәріге төзімділік, респираторлық вирустар, вирусқа қарсы препараттар.

IRSTI: 34.25;76.31

G.V. LUKMANOVA¹, N.G. KLIVLEYEVA¹, T.I. GLEBOVA¹, A.A. AITZHANOVA^{1*},
N.S. ONGARBAYEVA¹, M.G. SHAMENOVA¹, D.A. ISMAGULOVA¹, E.I. ISAEVA²

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary
academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

*e-mail: aida_91_20@mail.ru

RESISTANCE OF INFLUENZA VIRUSES TO ETIOTROPIC DRUGS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.01

Abstract

Respiratory viral infections, being the most widespread among all diseases in humans, cause enormous damage to human health and the economy. The co-circulation of various viruses and the variability of their correlation from season to season complicate the selection of agents for the prevention and treatment. In addition, infection with viruses that are resistant to specific drugs occurs frequently. Drug resistance in infectious agents is one of the major challenges of our time facing the biological and medical sciences. Drug resistance among viruses is the outcome of changes in their hereditary properties and is often associated with excessive use of medicines. The likelihood of the emergence of drug-resistant strains increases with the treatment duration in clinical practice. At the same time, more than 30% of resistant strains are found in patients who have never taken etiotropic drugs. It is therefore important to reveal the correlation between sensitive and resistant strains in the population and to understand the mechanisms for the emergence of resistance and possible ways to overcome it. Influenza viruses isolated in Kazakhstan since 2015 reveal sensitivity to oseltamivir-based drugs and a wide range of susceptibility to adamantane drugs. Study of the sensitivity of native viruses to antiviral drugs provides information for the formation of recommendations for the use of drugs intended to treat and prevent influenza infection in the population. Rational use and selection of drugs can reduce economic losses associated with a temporary disability among a part of the population during the epidemic period.

Keywords: drug resistance, respiratory viruses, antiviral drugs.

Acute respiratory viral infections (ARVI), which include influenza and coronavirus, are the most large-scale recurrent infections of mankind and pose a serious public health problem. In terms of social significance, huge damage to the health of the population and the economy, ARVIs take the first place among all human diseases [1, 2]. The share of seasonal acute respiratory viral infections accounts for 10-30% of temporary disability of the population. Usually ARVIs account for up to 40% of all adult diseases, more than 80% of all infectious diseases, more than 60% of childhood diseases. Every year seasonal epidemics lead to about 3-5 million cases of severe illness and about 250-500 thousand deaths [3]. The last pandemic caused by a coronavirus SARS-CoV-2 in 2019-2022, initiated a disease in more than 638 million people and claimed about 6.62 million lives [4].

As a result of large-scale anti-epidemic measures, the incidence of influenza and other acute respiratory viral infections has decreased over the past three years, however nevertheless never dropped to zero. The co-circulation of various respiratory viruses has recently been observed while the etiological interpretation of the epidemic process varies from year to year [5], which complicates the epidemic situation and, accordingly, the selection of agents for prevention and

treatment [6, 7, 8]. A particular difficulty is formed by the fact that viruses rapidly adapt to the used chemotherapy drugs with the formation of partial or complete resistance.

An effective strategy to combat respiratory viruses proposes the use of etiotropic chemotherapy drugs that have a direct influence on a specific target - a viral protein involved in the replication cycle [9, 10].

The most common etiotropic drugs used against influenza are represented on the domestic market today by four groups:

- ion channel blockers (adamantanes, rimantadine);
- specific hemagglutinin (HA) chaperone (arbidol);
- neuraminidase (NA) inhibitors (tamiflu (oseltamivir), relenza, peramivir)
- NP-protein inhibitors (ingavirin).

Etiotropic chemotherapy drugs against coronavirus are currently at the stage of development and testing [11], the treatment provided is in general symptomatic and preventing complications [12]. Remdesivir, a drug recommended in 2020 for the treatment of COVID-19 in the United States by the U.S. Food and Drug Administration [13] which inhibits the RNA-dependent RNA polymerase of the virus [14, 15], still raises many doubts and is not recommended by WHO [16].

The problem of therapy for respiratory viral infections is far from being solved today, since infection with viruses that are resistant to specific drugs often takes place. Drug resistance is the outcome of changes in the hereditary properties of viruses and develops with repeated use of drugs [17, 18]. Resistance is caused by mutations in the viral protein that is the target for the drug action [19, 20].

IV A(H1N1)pdm09, which caused the first pandemic in XXI century, initially turned out to be resistant to adamantane drugs, but susceptible to NA inhibitors of influenza viruses. However, the active use of oseltamivir has resulted in April 2009 in the emergence of several resistant mutants among the population of the novel pandemic strain. This determined the relevance of expanding monitoring of the emergence of resistant variants with further widespread use of the drug, especially in the treatment of mild forms and the prevention of the disease. Resistance to oseltamivir in 63% of cases is associated with the therapeutic and prophylactic use of the drug, 37% of resistant strains were detected in patients who had not previously taken specific antiviral drugs, which can be explained by the transfer of resistant strains from person to person [21].

IV resistance to adamantane drugs reaches 90% in certain countries, for example, in the USA [22] it is due to mutations in positions 26, 27, 30, 34 of the M2 protein [23]. It has been established that the substitutions V28L and S31N in the structure of this protein of modern pandemic viruses are strongly associated with resistance to adamantane antiviral drugs [24, 25].

The problem of chemoresistance also concerns NA inhibitors [26]. From 1999, when they appeared on the market, until the beginning of the 2007-2008 season the vast majority of circulating influenza viruses remained sensitive to these drugs while resistant strains were found in no more than 6% of cases. However, over the next 1–2 years, the proportion of resistant pathogens has risen significantly [27]. In Japan, by 2008-2009, it increased to almost 100%. In the 2012–2013 season, there were repeated reports of detection of A(H1N1)pdm09 strains that are resistant to oseltamivir in patients [28]. In a number of cases, resistant strains were detected in individuals not treated with NA inhibitors, which is evidence of the circulation of resistant strains among the population.

Resistance to specific drugs is caused by mutations in the genes encoding their target proteins. By this time scientists around the world have identified a number of such mutations in the IV genome. For instance, resistance to Tamiflu among strains A/H1N1 and A/H2N2 was revealed owing to the active site R292K and E119G NA [29]. The H275Y substitution in the NA surface glycoprotein of the influenza virus is responsible for resistance to oseltamivir [30]. In the Netherlands, a pandemic strain of influenza virus A(H1N1)pdm09 was isolated with the I223R mutation in NA, which caused a decrease in sensitivity to all existing NA inhibitors of influenza viruses. A(H1N1)pdm09 strains were reported that were identified in Singapore and Australia in 10 and 30% of cases, respectively, with the S247N mutation in the NA protein, which led to a

decrease in the sensitivity of viruses to oseltamivir and zanamivir [31]. Oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 viruses with the H275Y mutation have been isolated from patients in South Korea [32-35]. It was suggested that there are two H275Y mutation-associated substitutions in the NA protein of seasonal A(H1N1) strains, V234M and R222Q, which maintain viral viability and ensure stable NA activity. Study of a pair of oseltamivir-resistant and oseltamivir-sensitive IV A(H1N1) pdm09 strains in a ferret model has demonstrated a difference in the 275 position of the NA protein [36]. The first case of isolation of a type B IV strain resistant to this drug with the R152K mutation in NA was described in 1998 [37]. During the 2007-2008 season in Myanmar, IV A(H3N2) (<1.5% of examined cases) with Q136K and S31N mutations in NA and M2 proteins, respectively, were detected, which had reduced sensitivity to both zanamivir and rimantadine [38].

Molecular epidemiological data from numerous studies confirm that the H275Y mutation is frequently caused by selective selection under the effect of specific treatment [39]. In South Korea, the I117M mutation was also found in the NA of the A(H1N1)pdm09 influenza virus isolated from a patient taking oseltamivir and peramivir, which may be associated with reduced sensitivity to oseltamivir [40].

The formation of IV resistance to drugs leads to a problem when a set of existing antiviral agents is ineffective. As a result, selection of drug-resistant strains is observed in patients, and the likelihood of their emergence rises with increasing duration of treatment in clinical practice. It is therefore extremely important to have not only the widest possible range of anti-influenza drugs with different mechanisms of action, but also to understand the mechanisms of resistance and possible ways to overcome it.

Studies on the resistance of influenza viruses to chemotherapy drugs and the reasons for its formation are being carried out in numerous research centers around the world. Due to the high mutational variability, IVs circulating in different regions and at different times can vary significantly. Therefore, recommendations for prevention, treatment and vaccination developed abroad often turn out to be irrelevant for domestic health care.

The data obtained can contribute to the early detection of dangerous, treatment-resistant strains and the timely organization of anti-epidemic measures aimed at preventing the spread of infection. Identification of markers of resistance to chemotherapeutic agents makes it possible to accelerate the process of determining the resistance of newly emerging virus strains and to clarify the strategy for the treatment and prevention of influenza among the population of the Republic.

Work is also being carried out in Kazakhstan, the purpose of which is to study the issue of the development of drug-resistant forms of viruses as well as to find ways to overcome resistance. Experiments were carried out on the adaptation of IV reference strains

A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) and A/Swine/Iowa/30 (H1N1) to high concentrations of the antiviral drugs Tamiflu and Rimantadine. It was shown that the reference strains IV A/H1N7 and A/H7N7 have certain sensitivity to the above-named etiotropic chemotherapy drugs; mutant variants of these strains adapted to these drugs with modified biological properties of the major surface proteins were obtained. Analysis of sequencing data confirmed the correlation between changes in the phenotypic manifestations of hemagglutinin and NA proteins and modification of the genetic apparatus. A substitution in the M1 protein molecule at position 207, which is involved in the formation of resistance to the drug Tamiflu, has been identified, which has not been previously reported in the literature. An assumption was made about the multigenic nature of the emergence of resistance to Tamiflu [41].

Data on the sensitivity of reference viruses to drugs served as the basis for conducting such studies on the Kazakhstan strains of influenza virus [42].

Study of sensitivity to chemotherapy drugs showed the heterogeneity of the population of the Kazakhstan influenza viruses according to this characteristic. The reproduction of all examined viruses was inhibited by Tamiflu to varying degrees of effectiveness: the inhibitory concentration (IC₅₀) varied over a wide range of values from 0.60±0.3 to 25.38±1.5 mg/mL. With regard to rimantadine, viruses in general showed a lower degree of sensitivity: the reproduction of 73.91%

of isolates with the antigenic formula A/H1N1 was inhibited by the drug at various doses (IC_{50} was 3.49 ± 0.3 - 25.50 ± 3.0 mg/mL), 26.09% of the isolates were completely resistant to this drug. All examined viruses developed resistance to arbidol and ingavirin [43, 44]. Molecular biological analysis of indigenous IV strains showed the absence of molecular determinants of resistance in all studied isolates to adamantane drugs and oseltamivir-based drugs (Tamiflu) [45, 46, 47].

Study of the molecular and genetic characteristics of strains is a major link in both the system for monitoring evolutionary changes in the virus genome and sensitivity to antiviral drugs. Mutations that are the markers of resistance to antiviral drugs are of interest from the point of view of a genetic trait that makes it possible to identify a resistant strain. In addition, they are a novel genetic feature that can affect the virulent and reproductive properties of the virus. The study of the resistance of respiratory viruses to chemotherapy drugs promotes the development of effective tactics for combating both reference and novel native strains. It also makes it possible to identify new, genetically modified variants of viruses that are potentially dangerous to humans, to correct methods for treating and preventing influenza, which is very important for practical epidemiology.

Funding

The work was carried out within the framework of Scientific-Technical Program "Development of original domestic drugs with antiviral activity efficient against COVID-19 and influenza" within the framework of targeted MSHE RK funding.

References:

- 1 Seto W.H., Conly J.M., Pessoa-Silva C.L. et al. Infection prevention and control measures for acute respiratory infections in healthcare settings: an update East Mediterr Health J. 2013; 19 (Suppl. 1): S39–47.
- 2 <https://www.who.int/ru>
- 3 Zajceva O.V. Sovremennye vozmozhnosti profilaktiki i lecheniya ostryh respiratornyh zabolevanij. RMZh 2011;23:1458. Available from: http://www.rmj.ru/articles/bolezni_dykhatelnykh_putey/Sovremennye_vozmoghnosti_profilaktiki_i_lecheniya_ostryh_respiratornyh_zabolevaniy/#ixzz4TX3fqhGc
- 4 https://www.google.com/search?q=%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0+%D0%BF%D0%BE+%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D1%83+%D0%B2+%D0%BC%D0%B8%D1%80%D0%B5&bih=871&biw=1280&hl=ru&ei=LgV3Y6vFB4aDxc8P66eisAI&oq=%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0+%D0%BF%D0%BE+&gs_lcp=Cgxnd3Mtd2l6LXNlcuAQAARgEMgUIABCABDIFCAAQgAQyBQgAEIAEMggIABCABBDJAziFCAAQgAQyBQgAEIAEMgUIABCABDIFCAAQgAQyBQgAEIAEMgUIABCABDoICAAQgAQsAM6CAgAELEDEIMBOggIABCABBCxAzoLCAAQgAQsQMqgwE6EQguEIAEELED EIMBEMcBENEDOGgILhCxAXCDAToLCC4QgAQsQMqgwE6CwguEIAEELEDENQCOgQIABAD OgsILhCABBDHARCvAUoECEYYAUoECEYYAFCZB1iuL2C7TGgBcAB4AIABlwGIAakNkgEEMC4xNJgBAKABAcgBAcABAQ&scient=gws-wiz-serp Last accessed 22.11.2022
- 5 Kiselev O.I. Osnovnye geneticheskie faktory patogennosti virusov grippa tipa A i mesto pandemicheskogo virusa sredi patogennyh shtammov V: pod red. O.I. Kiseleva Genom pandemicheskogo virusa grippa A/H1N1v-2009. SPb.-M.: Kompaniya «Dimitrejd Grafik Grupp®», 2011:121-123.
- 6 Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Glebova T.I. Protivovirusnye preparaty dlja profilaktiki i lechenija grippa i ORVI. V: «Voprosy sovremennoj nauki»: kollekt. nauch. monografija; [pod red. N.R. Krasovskoj]. T. 52. M.: Internauka, 2020:7-31. <https://www.internauka.org/monograph/modern-science/52>.
- 7 Ivanova V.T., Matjushina R.O., Slepishkin A.N. i dr. Jependicheskie shtammy virusov grippa A i V v sezone 2005-2006 gg. v Rossii Vopr. virusol. 2008;4:13-18.
- 8 Kiselev O.I., Ershov F.I., Bykov A.T., Pokrovskij V.I. Pandemija grippa 2009/2010: protivovirusnaja terapija i taktika lechenija SPb.,2010:97.
- 9 FDA. Antiviral Drug Advisory Committee. Gaithersburg: Centre for Drug Evaluation and Research 2002: 1–266.

10 Shul'djakov A.A., Kuznecov V.I., Ljapina E.P. Sovremennye podhody k himioterapii ORVI i grippa - nekotorye aspekty problemy Trudnyj pacient 2010;8(12):4-7. Available from: <http://medi.ru/doc/310216.htm>

11 Berezin V, Bogoyavlenskiy A, Alexyuk M, Alexyuk P. Plant Metabolites as Antiviral Preparations Against Coronaviruses. J. Med Food 2021;10:1028-1038. doi: 10.1089/jmf.2020.0190

12 Klinicheskij protokol diagnostiki i lechenija: koronavirusnaja infekcija Covid-19 u vzroslyh. Odobren Ob#edinennoj komissiej po kachestvu medicinskih uslug MZ RK ot 25.07.2022 (Protokol №166) Available from: <https://diseases.medelement.com/disease/%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B%D0%BD%D0%B0%D0%B2%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81%D0%BD%D0%B0%D1%8F-%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F-c%D0%BEvid-19-%D1%83-%D0%B2%D0%B7%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D1%8B%D1%85-6-%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%BA%D0%BF-%D1%80%D0%BA-2022/17238> (Last accessed: 13.10.2022)

13 FDA Allows For 'Emergency Use' of Remdesivir, Experimental Coronavirus Drug. Time. Associated Press (1 мая 2020). Last accessed: 2 мая 2020.

14 Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Feng J.Y., Porter D.P., Götte M. The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. The Journal Of Biological Chemistry 2020; 10 April; 295(15): 4773—4779. doi:10.1074/jbc.AC120.013056. PMID 32094225.

15 Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Woolner E., Perry J.K., Feng J.Y., Porter D.P., Götte M. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. The Journal Of Biological Chemistry 2020; 15 May; 295(20): 6785—6797. doi:10.1074/jbc.RA120.013679 PMID 32284326.

16 WHO recommends against the use of remdesivir in COVID-19 patients. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-recommends-against-the-use-of-remdesivir-in-covid-19-patients> Дата обращения: 13.10.2022.

17 Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Monahova N.E. Varianty immunopatogeneza ostryh infekcij u detej. SPb: Foliant, 2007:254.

18 Beigel J., Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. Antiviral. Research. 2008; 78: 91-102.

19 Romancov M.G., Kiselev O.I., Sologub T.V. Jetiopatogeneticheskaja farmakoterapija ORVI i grippa. <http://www.lvrach.ru/2011/02/15435132/>

20 Romancov M.G., Ershov F.I., Kovalenko A.L. Protivovirusnye preparaty dlja lechenija ORVI i grippa u detej (klinicheskij obzor) Fundamental'nye issledovanija 2010;9:76-87. Available from: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=13379> (Last accessed: 14.10.2016).

21 Fedjakina I.T., Shhelkanov M.Ju., Derjabin P.G. i dr. Izuchenie chuvstvitel'nosti pandemicheskikh virusov grippa A 2009 H1N1 i vysokovirulentnyh virusov grippa ptic A(H5N1) k protivogrippoznym himiopreparatam. Antibiotiki i himioterapija 2011;56:3-4.

22 Leneva I.A. Pandemicheskij virus grippa 2009 H1N1 i sovremennye protivogrippoznye preparaty. RMZh 2010;9:597 http://www.rmj.ru/articles/infektsiya/Pandemicheskij_virus_grippa_2009_H1N1_i_sovremennye_protivogrippoznye_preparaty/#ixzz4NJyqR2x9

23 Monto A. Viral susceptibility and the choice of influenza antivirals. Clinical Infectious Diseases 2008; 47:346—348.

24 Barik S. New treatments for influenza. BMC Med. 2012;10:104. doi: 10.1186/1741-7015-10-104.

25 Garten R.J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science 2009;325:197—201.

26 Cvetkov V.V., Deeva Je.G., Danilenko D.M., i dr. Molekuljarno-geneticheskie faktory patogennosti virusa grippa A(H1N1)pdm09. Jependemiologija i infekcionnye bolezni 2014;19(4):4-11.

27 Dixit R., Khandaker G., Ilgoutz S. Emergence of oseltamivir resistance. Infectious Disorders — Drug Targets. 2013; 13 (1): 35—45.

28 Ustojchivost' k protivomikrobnym preparatam Informacionnyj bjulleten' №194 Aprel' 2015 g. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/ru/>

29 http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/

30 Brookes D.W., Miah Sh., Lackenby A., Hartgroves L., Barclay W.S., Pandemic H1N1 2009 influenza virus with the H275Y oseltamivir resistance neuraminidase mutation shows a small compromise

in enzyme activity and viral fitness, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* March 2011, Vol. 66, Issue 3: 466–470. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq486>

31 Weekly Epidemiol. Rec. 2011; 45: 497–508. <http://www.who.int/wer>, WHO. Influenza A(H1N1) Virus Resistance to Oseltamivir: 2008 Southern Hemisphere Influenza Season. http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summarysouth2008/en/index.html.-2008.

32 Calatayud L., Lackenby A., Reynolds A. et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infection in England and Scotland, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 1807–1815.

33 Shin S.Y., Kang C., Gwack J. et al. Drug-resistant pandemic (H1N1) 2009, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 702–704.

34 Sleeman K., Sheu T.G., Moore Z. et al. Influenza B viruses with mutation in the neuraminidase active site, North Carolina, USA, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 2043–2046.

35 Ujike M., Ejima M., Anraku A. et al. Monitoring and characterization of oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, Japan, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17: 470–479. *Weekly Epidemiol. Rec.* 2011; 45: 497–508. <http://www.who.int/wer>.

36 Duan S., Boltz D.A., Seiler P. et al. Oseltamivir-resistant pandemic H1N1/2009 influenza virus possesses lower transmissibility and fitness in ferrets. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (7): e1001022.

37 Gubareva L.V., Matrosovich M.N., Brenner M.K. et al. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *Emerg. Infect. Dis.* 1998;178:1257–1262.

38 Breslav N.V., Shevchenko E.S., Abramov D.D. i dr. Jefferktivnost' primeneniya antinejraminidaznyh himiopreparatov vo vremja pandemii grippa i v postpandemicheskiy period. *Voprosy virusologii* 2013;58(1):28-32.

39 Daput C., Suzuki Y., Saito R. et al. Rare influenza A (H3N2) variants with reduced sensitivity to antiviral drugs. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16:493-496.

40 Yi H., Lee J.Y., Hong E.H. et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16:1938-1942.

41 Korotetskiy I.S., Zubenkov N.V., Shvidko S.V. i dr. Analiz strukturnykh izmenenij genov virusa grippa A, otvetstvennykh za formirovanie fenotipa ustojchivosti k lekarstvennym preparatam. V: Vklad mikrobiologii i virusologii v sovremennuju bioindustriju: mater. mezhdunar. nauch. konf. Almaty, 2016:284-285.

42 Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Baimukhametova A.M. 2018–2019 antiviral drug sensitivity of the influenza virus strains isolated from various regions of Kazakhstan. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2021;11(6):1159-1166. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ADS-1497>

43 Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V. i dr. Harakteristika virusov grippa A(H1N1), vydelennykh v Aral'skom regione Respubliki Kazakhstan v 2015 g. V: Vklad mikrobiologii i virusologii v sovremennuju bioindustriju: mater. mezhdunar. nauch. konf. Almaty, 2016:313-317.

44 Lukmanova, G.V., Klivleyeva, N.G., Glebova, T.I., Sayatov, M.H., Ongarbayeva, N.S., Saktaganov, N.T., Shamenova, M.G., Kalkozhayeva, M.K., Baiseit, S.B., Baimukhametova, A.M., Amirasheva, L.K., Webby, R.J. Sensitivity of 2015 Kazakhstan influenza viruses to chemotherapy drugs. *Bulletin of the national academy of sciences of the republic of Kazakhstan* 2018;4:18-22. <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000450771300003>

45 Lukmanova G., Klivleyeva N., Glebova T., Saktaganov N., Ongarbayeva N., Baimukhametova A. Study of the 2019 A/H1N1 influenza virus susceptibility to chemotherapy drugs in ovo. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* Issue sup1: Special Issue: European Biotechnology Congress 2020. Poster Abstracts 2021;35:S62-128. Published online: 26 Feb 2021. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2020.1871545>

46 Glebova T.I., Klivleyeva N.G., Lukmanova G.V., Saktaganov N.T., Ongarbayeva N.S. Sensitivity of influenza virus strains isolated from various regions of Kazakhstan in 2018–2019 to antiviral drugs. *Clinical Medicine (Russian Journal).* 2021;99(4):276-281. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2021-99-4-276-281>

47 Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Korotetskiy I., Glebova T., Saktaganov N., Shamenova M., Baimukhanova B., Shevtsov A., Amirgazin A., Berezin V., Webby R. Complete Genome Sequence of Swine Influenza Virus Isolate A/swine/Karaganda/04/2020 (H1N1) from Kazakhstan. *Microbiology Resource Announcements* 2021;10(39):e00786 10:e00786-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00786-21>

МРНТИ: 34.27.39, 62.09.39, 65.33.29

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.В. ЧИЖАЕВА¹, М.Б. АЛИМЖАНОВА¹, А.А. АМАНГЕЛДИ¹,
М.Г. САУБЕНОВА¹, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, Н.В. КЛИПИНА², Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹,
Д.Д. БОКЕНОВ¹

¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

² Еркін талғам, Алматы, Казахстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ПОСЛЕДНИЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ХЛЕБОПЕЧЕНИЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.02

Аннотация

Хлеб – стратегически важный продукт питания. Обеспечение его качества и безопасности всегда остается актуальным. В обзоре представлены данные мировой научной литературы по основным современным направлениям исследований в области хлебопечения. Показаны основные задачи, встающие в настоящее время перед сотрудниками хлебопекарной промышленности и учеными, занимающимися разработкой новых хлебопекарных продуктов и заквасок. Раскрыта значимая роль применения заквасок на основе молочнокислых бактерий в обеспечении качества и безопасности хлебопекарной продукции.

Ключевые слова: хлеб, закваска, безопасность, качество, молочнокислые бактерии.

Хлеб – один из основных продуктов питания человека, первостепенно значимый при низком уровне доходов, и являющийся основой пирамиды продовольственной безопасности [1]. До половины состава хлеба приходится на долю полисахаридов, выполняющих энергетическую функцию. Химический состав хлеба включает также белки, жиры, незаменимые аминокислоты, витамины и минералы. В более поздних культиварах пшеницы отмечается тенденция к повышению содержания крахмала и снижению количества белков [2]. Так, хлеб из белой пшеничной муки содержит очень мало витаминов группы В, а содержание в нем клетчатки не превышает 0,1% при суточной норме 25 г [3].

Повышение качества и безопасности хлеба является главным направлением исследований в области хлебопечения [4]. В последнее время возникают новые вопросы в области безопасности, связанные, в частности, с образованием при термической обработке пищи новых контаминантов, таких как акриламид и фурфурол [5]. Однако вопросы, связанные с микробной контаминацией, по-прежнему актуальны. Повышенное беспокойство потребителей связано с уровнем качества и безопасности продовольственного зерна, в первую очередь с его грибковым загрязнением [6-8]. Факторы, влияющие на качество и безопасность хлеба, представлены на рисунке 1.

Оптимальными путями решения проблемы являются обеспечение экологически безопасной защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей и сохранности урожая, улучшения условий хранения продукции растениеводства, использование биологически безопасных средств улучшения качества и безопасности хлеба в виде стартовых заквасок, включающих активные ассоциации молочнокислых бактерий и других микроорганизмов.

Последние исследования в области хлебопечения направлены на повышение безопасности хлеба [9], его питательной ценности, содержания значимых для поддержания здоровья биологически активных соединений, органолептических показателей, срока годности и доступности [10, 11]. В области безопасности усилия направлены не только на обеспечение защиты от загрязняющих и микотоксигенных микроорганизмов [12], но и на снижение химического риска, связанного с образованием отдельных соединений, таких как акролеин [13], и аллергенности хлеба [14]. Отдельное внимание уделено разработке

безглютенового хлеба [15].



Рисунок 1 – Факторы, влияющие на качество и безопасность хлеба

В области питательной ценности и других показателей готового хлеба работа ведется в двух основных направлениях: технологическом и микробиологическом. Изменение рецептуры является основной стратегией разработки ориентированных на здоровье продуктов [16]. Разработка технологий получения новых сортов хлеба основывается преимущественно на более широком использовании цельнозернового хлеба [17], ржаной [18] и других видов муки, включая нетрадиционные, введении в состав пекарской смеси различных растительных добавок (овощных, фруктовых, семян) для обогащения пищевыми волокнами и другими биологически активными веществами [19-22], фортификации хлеба белком зернобобовых культур [23-25], витаминами и микроэлементами [26]. Благодаря технологическим разработкам ассортимент хлебобулочных изделий в значительной мере расширился в последние годы как в мире, так и в Казахстане [27].

Основное внимание исследователей в области биотехнологии и микробиологии направлено в последние годы преимущественно на изучение влияния хлебных заквасок, основанных на молочнокислых бактериях и некоторых других микроорганизмах на различные показатели хлеба. Отмечается устойчивая тенденция к использованию хлебных заквасок, близких к спонтанным, и замене заквасок, основанных на пекарских дрожжах, заквасками из молочнокислых бактерий, часто включающих также дикие штаммы дрожжей. В последние годы показан первостепенный вклад подбора закваски в обеспечение качества и безопасности хлеба, повышение его органолептических показателей и биологической ценности. Основные направления воздействия закваски на различные значимые показатели хлеба представлены на рисунке 2. Отмечено лучшее качество, питательная ценность и биодоступность хлеба, полученного с использованием заквасок в сравнении с хлебом на основе хлебопекарных дрожжей [28]. Подчеркивается возможность подавления возбудителей картофельной болезни хлеба и предупреждения порчи плесневыми грибами за счет использования защитных культур микроорганизмов [9, 12].

Canesin и соавторами [28] показано повышение биологической ценности хлеба использованием заквасок на основе молочнокислых бактерий: продукция биоактивных пептидов и производных аминокислот, потенциально пребиотических экзополисахаридов; увеличение усвоения витаминов, минералов, фотохимических веществ; снижение гликемического индекса хлеба. Suo и соавторами выявлено [29], что закваски из молочнокислых бактерий, имеют более высокую противогрибковую активность, образуют более обильные ароматические соединения, имеют более высокую питательную ценность



Рисунок 2 – Влияние заквасок на основе молочнокислых бактерий на показатели хлеба

и обладают активностью по снижению содержания акриламида в сравнении с заквасками из хлебопекарных дрожжей. А одновременное использование закваски и растительных добавок может оказать дополнительные или более выраженные эффекты, например, ферментация закваской клубней топинамбура снижает концентрацию акриламида в хлебе на 15% [30]. Использование закваски для хлеба также способствует деградации фитиновой кислоты и, соответственно, высвобождение и большую доступность железа [31].

Анализ последней литературы, проведенный Агога и соавторами [32]), показал, что ферментация с помощью закваски увеличивала биодоступность минералов, позволяла обогащать ее пищевыми волокнами, снижала гликемический индекс, улучшала усвояемость белка и уменьшала содержание антипитательных факторов. Reale и соавторами также подтверждено влияние закваски на повышение усвояемости и продукцию потенциально биоактивных соединений в хлебе [33].

Исследование летучих ароматических соединений различных заквасок и хлеба на их основе показало наличие 196 летучих соединений, влияющих на органолептические показатели и включающих в первую очередь альдегиды, спирты и сложные эфиры, которые составляли в сумме 111 различных соединений [34]. Следующие по представленности 57 химических соединений составляли кетоны, кислоты, фураны и пиразины. Остальные соединения были единичны. Отмечено также, что профиль летучих и нелетучих соединений цельнозернового хлеба с использованием смешанных заквасок зависел от соотношения молочнокислых бактерий и дрожжей внутри закваски [35].

Разработка заквасок для цельнозернового и обогащенного отрубями хлеба составляет отдельное направление исследований в области микробиологии и биотехнологии хлебопечения, и является крайне актуальной, поскольку использование цельнозернового хлеба востребовано потребителями и непосредственно связывается с улучшением здоровья [36-38]. Однако проблемой в этой области является влияние компонентов оболочки и зародыша зерна на технологические, в частности реологические свойства, органолептические показатели и биобезопасность теста и хлеба [39-41]. Ма и соавторами [39] показано значимое влияние закваски на свойства цельнозернового хлеба, в частности, снижение содержания антипитательных факторов, токсичных и вредных веществ. Исследование влияния микроорганизмов закваски на показатели хлеба показывает вклад отдельных видов термофильных молочнокислых бактерий в улучшение целого перечня

значимых показателей, а именно продукцию ароматических соединений, подавление грибковой порчи, пористость, эластичность, рассыпчатость и влажность хлеба [42].

Значительная часть исследований в области хлебных заквасок посвящена изучению естественных микробиомов спонтанных заквасок, полученных с использованием различных растительных материалов [43, 44]. Сделан вывод о том, что тщательный отбор аутохтонных многофункциональных микробных штаммов может обеспечить стабильное повышение безопасности и улучшение питательных, органолептических и функциональных свойств зерновых продуктов [45].

С точки зрения стабильных свойств закваски представляют интерес также работы по подбору оптимальных условий высушивания закваски [46].

Таким образом, разработка хлебных заквасок охватывает различные современные направления работы по улучшению качества и безопасности хлеба, оказывая влияние на все показатели готового продукта, повышая биологическую ценность, потребительскую привлекательность и срок годности хлеба и поэтому является актуальным направлением исследований в области хлебопечения.

Литература:

- 1 Зорин А.С. Хлеб – основа пирамиды продовольственной безопасности. URL: <https://bac-forum.ru/articles/71-hleb-osnova-piramidy-prodovolstvennoi-bezopasnosti.html>. (дата обращения 20.10.2022)
- 2 Brouns F., Geisslitz S., Shewry P.R. Is bread bad for health? // Journal of Cereal Science. – 2022. – Vol. 105. – Art. ID 103447. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103447>
- 3 Мелькунова О.С. Ингредиентный состав хлебобулочных изделий и степень его влияния на организм // IX Международная студенческая научная конференция «Студенческий научный форум 2017». – Владимир: ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых», 2016. – 43 с. <https://scienceforum.ru/2017/article/2017030957>
- 4 Ma M., Sun Q.J., Li M., Zhu K.X. Deterioration mechanisms of high-moisture wheat-based food – A review from physicochemical, structural, and molecular perspectives // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 318. – Art. ID 126495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126495>
- 5 Taş N.G., Kocadağlı T., Gökmen V. Safety concerns of processed foods in terms of neo-formed contaminants and NOVA classification // Current Opinion in Food Science. – 2022. – Vol. 47. – Art. ID 100876. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100876>
- 6 Zhu H., Jackson P., Wang W. Consumer anxieties about food grain safety in China // Food Control. – 2017. – Vol. 73, Part B. – P. 1256-1264. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.045>
- 7 Mohapatra D., Kumar S., Kotwaliwale N., Singh K.K. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control // Industrial Crops and Products. – 2017. – Vol. 108. – P. 162-182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.039>
- 8 Чижаяева А.В., Олейникова Е.А., Амангелды А.А., Айтжанова А.А., Саубенова М.Г., Шемшур О.Н., Елубаева М.Е., Алыбаева А.Ж. Хлебные закваски как биотехнологический способ улучшения качества и безопасности муки // Микробиология және вирусология. – 2020. - №2(29). – С. 15-39.
- 9 Тумашова Елена. В РК начнут печь хлеб с повышенным содержанием витаминов. Пекарни оценят казахстанскую разработку. URL: <https://kapital.kz/business/72231/v-rk-nachnut-pech-khleb-s-povyshennym-soderzhaniyem-vitaminov.html> 26.09.2018 (дата обращения 27.10.2022)
- 10 Mariscal-Moreno R.M., Chuck-Hernández C., Figueroa-Cárdenas J. de D., Serna-Saldivar S. O. Physicochemical and nutritional evaluation of bread incorporated with ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) and black bean (*Phaseolus vulgaris*) // Processes. – 2021. – Vol. 9(10). <https://doi.org/10.3390/pr9101782>
- 11 Le Lay C., Mounier J., Vasseur V., Weill A., Le Blay G., Barbier G., Coton E. In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds // Food Control. – 2016. – Vol. 60. – P. 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>
- 12 Zhang J., Schwab C. Is acrolein a reuterin-borne chemical hazard in biopreserved foods? // Food Chemistry Advances. – 2022. – Vol. – 1. – Art. ID 100044. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100044>
- 13 Abd Rahim M.H., Hazrin-Chong N.H., Harith H.H., Al Qadr Imad Wan-Mohtar W.A., Sukor R. Roles of fermented plant-, dairy- and meat-based foods in the modulation of allergic responses // Food Science and Human Wellness. – 2023. – Vol. - 12, Issue 3. – P. 691-701.

<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.09.002>

14 Föste M., Verheyen C., Jekle M., Becker T. Fibres of milling and fruit processing by-products in gluten-free bread making: A review of hydration properties, dough formation and quality-improving strategies // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 306. – Art. ID 125451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125451>

15 Muneke P.E.S., Pérez-Álvarez J.Á., Pateiro M., Viuda-Matos M., Fernández-López J., Lorenzo J.M. Satiety from healthier and functional foods // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 113. – P. 397-410. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.025>

16 de Hoogh I.M., van der Kamp J.W., Wopereis S. The potential of personalized nutrition for improving wholegrain consumption // Journal of Cereal Science. – 2022. – Vol. 107. – Art. ID 103505. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103505>

17 Семёнов П.Н. Пищевая ценность хлеба из смеси ржаной и пшеничной муки // Матер. междунар. научно-практич. конф., посвящ. 100-летию Горского ГАУ «Научное обеспечение устойчивого развития агропромышленного комплекса горных и предгорных территорий». – Владикавказ: Горский государственный аграрный университет, 2018. – Том 2. – С. 152-154.

18 Калмыкова О.В., Мартыненко Д.В. Использование растительных добавок с целью повышения пищевой ценности и физиологической значимости хлебобулочных изделий // Матер. междунар. научно-практич. конф., посвящ. 75-летию окончания Сталинградской битвы «Мировые научно-технологические тенденции социально-экономического развития апк и сельских территорий». – Волгоград: Волгоградский государственный аграрный университет, 2018. – Том 2. – С. 75-80. <https://elibrary.ru/item.asp?id=35401240>

19 Русакова Н.А., Власова В.Н. Применение растительного сырья для повышения пищевой ценности хлеба // Парадигма. – 2018. – №1. – С. 10-17. <https://elibrary.ru/item.asp?id=42917577>

20 Dhen N., Rejeb I.B., Boukhris H., Damergi C., Gargouri M. Physicochemical and sensory properties of wheat- Apricot kernels composite bread // LWT. – 2018. – Vol. 95. – P. 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.068>

21 Torbica A., Radosavljević M., Belović M., Djukić N., Marković S. Overview of nature, frequency and technological role of dietary fibre from cereals and pseudocereals from grain to bread // Carbohydrate Polymers. – 2022. – Vol. 290. – Art. ID 119470. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119470>

22 Альшакова Е.А. Использование хлеба функционального назначения для обеспечения полноценного питания населения // Сборник науч. статей VII Междунар. научно-практич. конф. «Новые концептуальные подходы к решению глобальной проблемы обеспечения продовольственной безопасности в современных условиях». – Курск: Юго-Западный государственный университет, 2020. – С. 31-34. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44308426>

23 Boukid F., Zannini E., Carini E., Vittadini E. Pulses for bread fortification: A necessity or a choice? // Trends in Food Science and Technology. – 2019. – Vol. 88. – P. 416-428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.007>

24 Gallo V., Romano A., Ferranti P., D'Auria G., Masi P. Properties and in vitro digestibility of a bread enriched with lentil flour at different leavening times // Food Structure. – 2022. – Vol. 33. – Art. ID 100284. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100284>

25 Vishwakarma S., Dalbhagat C.G., Mandliya S., Mishra H.N. Investigation of natural food fortificants for improving various properties of fortified foods: A review // Food Research International. – 2022. – Vol. 156. – Art. ID 111186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111186>

26 Шпис А.А., Мусрепова С.А. Хлебный рынок Казахстана и новый вид хлеба // Матер. II Всерос. (нац. научно-практич. конф. с междунар. Участием) «Современные проблемы финансового регулирования и учета в агропромышленном комплексе». – Лесниково: Курганская государственная сельскохозяйственная академия им. Т.С. Мальцева, 2018. – С. 636-639. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35044201>

27 Canesin M.R., Betim Cazarin C.B. Nutritional quality and nutrient bioaccessibility in sourdough bread // Current Opinion in Food Science. – 2021. – Vol. 40. – P. 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>

28 Suo B., Chen X., Wang Y. Recent research advances of lactic acid bacteria in sourdough: origin, diversity, and function // Current Opinion in Food Science. – 2021. – Vol. 37. – P. 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.007>

29 Bartkiene E., Jakobsone I., Juodeikiene G., Vidmantienė D., Pugajeva I., Bartkevics V. Effect of fermented *Helianthus tuberosus* L. tubers on acrylamide formation and quality properties of wheat bread //

LWT - Food Science and Technology. – 2013. – Vol. 54, Issue 2. – P. 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.015>

30 Rodriguez-Ramiro I., Brearley C.A., Bruggaber S.F.A., Perfecto A., Shewry P., Fairweather-Tait S. Assessment of iron bioavailability from different bread making processes using an in vitro intestinal cell model // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 228. – P. 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.130>

31 Arora K., Ameer H., Polo A., Di Cagno R., Rizzello C.G., Gobbetti M. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 108. – P. 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>

32 Reale A., Di Stasio L., Di Renzo T., De Caro S., Ferranti P., Picariello G., Addeo F., Mamone G. Bacteria do it better! Proteomics suggests the molecular basis for improved digestibility of sourdough products // Food Chemistry, Volume. – 2021. – Vol. 359. – Art. ID 129955. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129955>

33 Pétel C., Onno B., Prost C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review // Trends in Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 59. – P. 105-123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>

34 Warburton A., Silcock P., Eyres G.T. Impact of sourdough culture on the volatile compounds in wholemeal sourdough bread // Food Research International. – 2022. – Vol. 161. – Art. ID 111885. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111885>

35 Lappi J., Mykkänen H., Kolehmainen M., Poutanen K. Wholegrain foods and health // In: Delcour J.A., Poutanen K. (Eds.) Fibre-Rich and Wholegrain Foods. Improving Quality. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. – Oxford, Cambridge, Philadelphia, New Delhi: Woodhead Publishing, 2013. – P. 76-95. <https://doi.org/10.1533/9780857095787.1.76>

36 Gordon D.T., Wrigley C. Whole-grain versus refined products // In: The Encyclopedia of Grain Science. – Cambridge: Academic Press, 2004. – P. 424-429.

37 Parenti O., Guerrini L., Zanoni B. Techniques and technologies for the breadmaking process with unrefined wheat flours // Trends in Food Science and Technology. – 2020. – Vol. 99. – P. 152-166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.034>

38 Ma S., Wang Z., Guo X., Wang F., Huang J., Sun B., Wang X. Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges—A review // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 360, – Art. ID 130038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130038>

39 Parenti O., Guerrini L., Cavallini B., Baldi F., Zanoni B. Breadmaking with an old wholewheat flour: Optimization of ingredients to improve bread quality // LWT. – 2020. – Vol. 121. – Art. ID 108980. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108980>

40 Heiniö R.L., Noort M.W.J., Katina K., Alam S.A., Sozer N., de Kock H.L., Hersleth M., Poutanen K. Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – A review // Trends in Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 47. – P. 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.002>

41 Cizeikiene D., Jagelaviciute J., Stankevicius M., Maruska A. Thermophilic lactic acid bacteria affect the characteristics of sourdough and whole-grain wheat bread // Food Bioscience. – 2020. – Vol. 38. – Art. ID 100791. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100791>

42 Ripari V., Gänzle M.G., Berardi E. Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials // International Journal of Food Microbiology. – 2016. – Vol. 232. – P. 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.025>

43 Oshiro M., Zendo T., Nakayama J. Diversity and dynamics of sourdough lactic acid bacteria created by a slow food fermentation system // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2021. – Vol. 131, Issue 4. – P. 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.007>

44 Ogunremi O.R., Banwo K., Sanni A.I. Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: trends in selection and application // Current Opinion in Food Science. – 2017. – Vol. 13. – P. 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.003>

45 Albagli G., do Monte Schwartz I., Amaral P.F.F., Ferreira T.F., Finotelli P.V. How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread // LWT. – 2021. – Vol. 149. – Art. ID 111888. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111888>

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.В. ЧИЖАЕВА¹, М.Б. АЛИМЖАНОВА¹, А.А. АМАНГЕЛДІ¹,
М.Г. САУБЕНОВА¹, А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, Н.В. КЛИПИНА², Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹,
Д.Д. БОКЕНОВ¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми - өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Еркін талғам, Алматы, Қазақстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

НАН ПІСІРУ САЛАСЫНДАҒЫ ЗЕРТТЕУЛЕРДІҢ ДАМУЫНЫҢ СОҢҒЫ БАҒЫТТАРЫ

Түйін

Нан – стратегиялық маңызды азық-түлік өнімі. Оның сапасы мен қауіпсіздігін қамтамасыз ету әрқашан өзекті. Әдеби шолуда нан пісіру саласындағы зерттеулердің негізгі заманауи бағыттары бойынша әлемдік ғылыми әдебиеттердің деректері ұсынылған. Қазіргі уақытта нан пісіру өнеркәсібінің қызметкерлері мен жаңа нан өнімдерін және ашытқыларды әзірлеумен айналысатын ғалымдардың алдында тұрған негізгі міндеттер көрсетілген. Нан өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігін қамтамасыз етуде сүтқышқылды бактериялар негізіндегі ашытқыларды қолданудың маңызды рөлі анықталды.

Кілтті сөздер: нан, ашытқы, қауіпсіздік, сапа, сүтқышқылды бактериялар.

IRSTI: 34.27.39, 62.09.39, 65.33.29

Ye.A. OLEINIKOVA^{1*}, A.V. CHIZHAYEVA¹, M.B. ALIMZHANOVA¹,
A.A. AMANGELDI¹, M.G. SAUBENOVA¹, A.Zh. ALYBAYEVA¹, N.V. KLIPINA²,
Zh. N. YERMEKBAY¹, D.D. BOKENOV¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

² Erkin talgam, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

LATEST DIRECTIONS OF DEVELOPMENT OF RESEARCH IN THE FIELD OF BAKERY

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.02

Abstract

Bread is a strategically important food product. Ensuring its quality and safety is always relevant. The review presents data from the world's scientific literature on the main modern areas of research in the field of baking. The main tasks currently facing the employees of the baking industry and scientists involved in the development of new baking products and starter cultures are shown. The significant role of the use of starter cultures based on lactic acid bacteria in ensuring the quality and safety of bakery products is revealed.

Keywords: bread, sourdough, safety, quality, lactic acid bacteria.

Bread is one of the main human food products, it is of paramount importance at low-income levels, and is the basis of the food security pyramid [1]. Up to half of the composition of bread falls on the share of polysaccharides that perform an energy function. The chemical composition of bread also includes proteins, fats, essential amino acids, vitamins, and minerals. There is a trend towards an increase in the content of starch and a decrease in protein content in later wheat cultivars [2]. Thus, bread made from white wheat flour contains very few B vitamins, and its fiber content does not exceed 0.1% at a daily rate of 25 g [3].

Improving the quality and safety of bread is the main direction of research in the field of bakery [4]. Recently, new safety issues have arisen, related in particular to the formation of new

contaminants during the heat treatment of food, such as acrylamide and furfural [5]. However, issues related to microbial contamination are still relevant. Increased consumer concern is associated with the level of quality and safety of food grains, primarily with its fungal contamination [6-8]. Factors affecting the quality and safety of bread are shown in Figure 1.

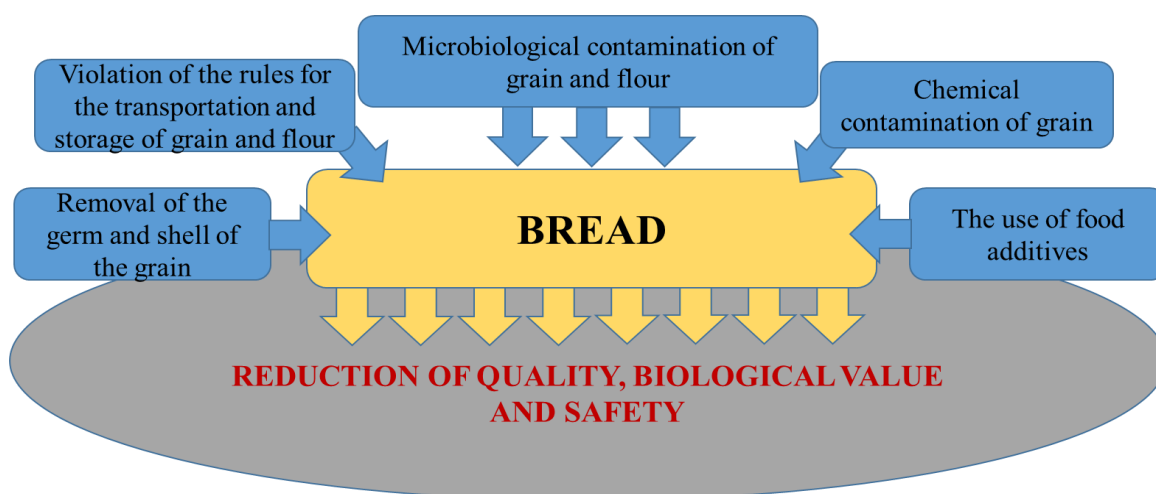


Figure 1 - Reasons for the decline in the quality and safety of bread

The best ways to solve the problem are to ensure environmentally safe protection of agricultural crops from diseases and pests and crop safety, improve storage conditions for crop products, and use biologically safe means for improving the quality and safety of bread in the form of starter cultures, including active associations of lactic acid bacteria and other microorganisms.

Recent research in the field of bread baking is aimed at improving the safety of bread [9], its nutritional value, and the content of biologically active compounds important for maintaining health, sensory indicators, shelf life, and availability [10, 11]. In the field of safety, efforts are directed not only to provide protection against contaminants and mycotoxigenic microorganisms [12] but also to reduce the chemical risk associated with the formation of certain compounds such as acrolein [13] and the allergenicity of bread [14]. Special attention is paid to the development of gluten-free bread [15].

In the field of nutritional value and other indicators of finished bread, work is carried out in two main areas: technological and microbiological. Reformulation is the main strategy for the development of health-oriented products [16]. The development of technologies for obtaining new varieties of bread is based mainly on the wider use of whole grain bread [17], rye [18], and other types of flour including non-traditional ones, the introduction of various vegetable additives (vegetables, fruit, seeds) into the baking mixture for enrichment with dietary fiber and other biologically active substances [19-22], fortification of bread with protein of leguminous crops [23-25], vitamins and microelements [26]. Thanks to technological developments, the range of bakery products has expanded significantly in recent years, both in the world and in Kazakhstan [27].

The main attention of researchers in the field of biotechnology and microbiology has been directed in recent years mainly to the study of the effect of bread sourdoughs based on lactic acid bacteria and some other microorganisms on various indicators of bread. There is a strong trend towards the use of bread starters close to spontaneous and the replacement of starters based on baker's yeast with starters from lactic acid bacteria, often also including wild strains of yeast. In recent years, the primary contribution of the selection of sourdough to ensuring the quality and safety of bread, increasing its sensory characteristics and biological value has been shown. The main directions of the impact of sourdough on various significant indicators of bread are shown in Figure 2.

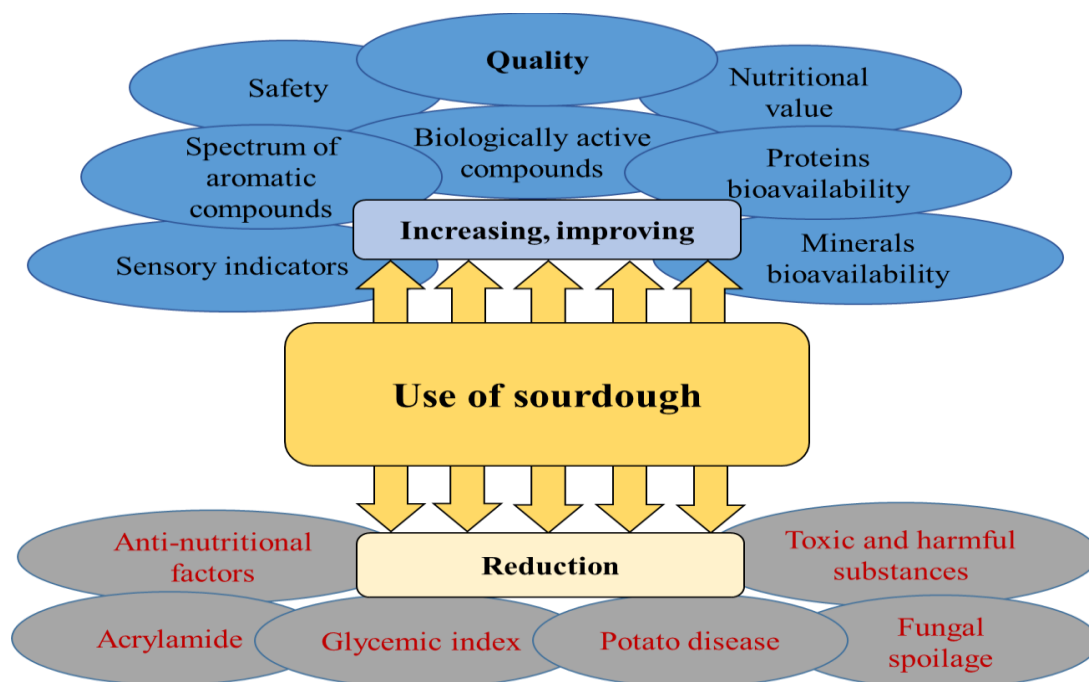


Figure 2 - The influence of sourdough based on lactic acid bacteria on the performance of bread

The best quality, nutritional value, and bioavailability of bread obtained using sourdough in comparison with bread based on baker's yeast were noted [28]. The possibility of suppressing the causative agents of potato disease of bread and preventing spoilage by mold fungi through the use of protective cultures of microorganisms is emphasized [9, 12].

Canesin and co-authors [28] showed an increase in the biological value of bread using sourdoughs based on lactic acid bacteria: production of bioactive peptides and amino acid derivatives, potentially prebiotic exopolysaccharides; increase in the absorption of vitamins, minerals, photochemical substances; lowering the glycemic index of bread. Suo et al [29] found that lactic acid bacteria starter cultures have higher antifungal activity, more abundant aromatic compounds, higher nutritional value, and acrylamide reduction activity compared to baker's yeast starter cultures. The simultaneous use of sourdough and vegetable additives can have additional or more pronounced effects, for example, the fermentation of Jerusalem artichoke tubers with sourdough reduces the concentration of acrylamide in bread by 15% [30]. The use of sourdough for bread also contributes to the degradation of phytic acid and, accordingly, the release and greater availability of iron [31].

The analysis of the latest literature by Arora et al [32]) showed that sourdough fermentation increased mineral bioavailability, allowed for dietary fiber enrichment, lowered the glycemic index, improved protein digestibility, and reduced antinutritional factors. Reale et al. also confirmed the effect of sourdough on the increase in digestibility and production of potentially bioactive compounds in bread [33].

The study of volatile aromatic compounds of various sourdoughs and bread based on them showed the presence of 196 volatile compounds that affect sensory parameters and include primarily aldehydes, alcohols, and esters, which amounted to 111 different compounds in total [34]. The next 57 compounds were ketones, acids, furans, and pyrazines. The remaining chemical compounds were in a single amount. It was also noted that the profile of volatile and non-volatile compounds of whole grain bread using mixed starters depended on the ratio of lactic acid bacteria and yeast within the starter [35].

The development of sourdoughs for whole grain and bran-enriched bread is a separate area of research in the field of microbiology and biotechnology of bakery and is extremely relevant since the use of whole grain bread is in demand by consumers and is directly associated with improved health [36-38]. However, a problem in this area is the influence of the components of

the shell and germ of the grain on technological, in particular rheological properties, sensory characteristics, and biosafety of dough and bread [39-41]. Ma and co-authors [39] showed a significant effect of sourdough on the properties of whole grain bread, in particular, a decrease in the content of anti-nutritional factors, and toxic and harmful substances. The study of the effect of sourdough microorganisms on bread indicators shows the contribution of certain types of thermophilic lactic acid bacteria to the improvement of a whole list of significant indicators, namely the production of aromatic compounds, the suppression of fungal spoilage, porosity, elasticity, friability and moisture content of bread [42].

A significant part of research in the field of bread sourdoughs is devoted to the study of natural microbiomes of spontaneous sourdoughs obtained using various plant materials [43, 44]. It was concluded that careful selection of autochthonous multifunctional microbial strains could provide a stable increase in safety and improve the nutritional, sensory, and functional properties of cereal products [45].

From the point of view of the stability of the properties of sourdough, works on the selection of optimal conditions for drying the starter are also of interest [46].

Thus, the development of sourdough starters covers various modern areas of work to improve the quality and safety of bread, influencing all indicators of the finished product, increasing the biological value, consumer attractiveness, and shelf life of bread, and therefore is an important area of research in the field of bread baking.

References:

1 Zorin A.S. Hleb – osnova piramidy prodovol'stvennoj bezopasnosti. URL: <https://bac-forum.ru/articles/71-hleb-osnova-piramidy-prodovol'stvennoi-bezopasnosti.html>. (Date of reference 20.10.2022)

2 Brouns F., Geisslitz S., Shewry P.R. Is bread bad for health? Journal of Cereal Science. 2022. Vol. 105. Art. ID 103447. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103447>

3 Mel'kunova O.S. Ingredientnyj sostav hlebobulochnyh izdelij i stepen' ego vlijaniya na organizm. IX Mezhdunarodnaja studencheskaja nauchnaja konferencija «Studencheskij nauchnyj forum 2017». Vladimir: FGBOU VO «Vladimirskij gosudarstvennyj universitet im. A.G. i N.G. Stoletovyh», 2016. 43 s. <https://scienceforum.ru/2017/article/2017030957>

4 Ma M., Sun Q.J., Li M., Zhu K.X. Deterioration mechanisms of high-moisture wheat-based food – A review from physicochemical, structural, and molecular perspectives. Food Chemistry. 2020. Vol. 318. Art. ID 126495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126495>

5 Taş N.G., Kocadağlı T., Gökmen V. Safety concerns of processed foods in terms of neo-formed contaminants and NOVA classification. Current Opinion in Food Science. 2022. Vol. 47. Art. ID 100876. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100876>

6 Zhu H., Jackson P., Wang W. Consumer anxieties about food grain safety in China. Food Control. 2017. Vol. 73, Part B. P. 1256-1264. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.045>

7 Mohapatra D., Kumar S., Kotwaliwale N., Singh K.K. Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. Industrial Crops and Products. 2017. Vol. 108. P. 162-182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.039>

8 Chizhayeva A.V., Oleynikova Ye.A., Amangeldy A.A., Aytzhanova A.A., Saubenova M.G., Shemshura O.N., Yelubayeva M.Ye., Alybayeva A.ZH. Khlebnyye zakvaski kak biotekhnologicheskij sposob uluchsheniya kachestva i bezopasnosti muki // Mikrobiologiya zhəne virusologiya. – 2020. - №2(29). – S. 15-39.

9 Tumashova Elena. V RK nachnut pech' hleb s povyshennym soderzhaniem vitaminov. Pekarni ocenjat kazhastanskiju razrabotku. URL: <https://kapital.kz/business/72231/v-rk-nachnut-pech-khleb-s-povyshennym-soderzhaniyem-vitaminov.html> 26.09.2018 (date of reference 27.10.2022)

10 Mariscal-Moreno R.M., Chuck-Hernández C., Figueroa-Cárdenas J. de D., Serna-Saldivar S. O. Physicochemical and nutritional evaluation of bread incorporated with ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) and black bean (*Phaseolus vulgaris*). Processes. 2021. Vol. 9(10). <https://doi.org/10.3390/pr9101782>

11 Le Lay C., Mounier J., Vasseur V., Weill A., Le Blay G., Barbier G., Coton E. In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. Food Control. 2016. Vol. 60. P. 247-255. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>

12 Zhang J., Schwab C. Is acrolein a reuterin-borne chemical hazard in biopreserved foods? Food

Chemistry Advances. 2022. Vol. 1. Art. ID 100044. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100044>

13 Abd Rahim M.H., Hazrin-Chong N.H., Harith H.H., Al Qadr Imad Wan-Mohtar W.A., Sukor R. Roles of fermented plant-, dairy- and meat-based foods in the modulation of allergic responses. Food Science and Human Wellness. 2023. Vol. 12, Issue 3. P. 691-701. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.09.002>

14 Föste M., Verheyen C., Jekle M., Becker T. Fibres of milling and fruit processing by-products in gluten-free bread making: A review of hydration properties, dough formation and quality-improving strategies. Food Chemistry. 2020. Vol. 306. Art. ID 125451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125451>

15 Muneke P.E.S., Pérez-Álvarez J.Á., Pateiro M., Viuda-Matos M., Fernández-López J., Lorenzo J.M. Satiety from healthier and functional foods. Trends in Food Science and Technology. 2021. Vol. 113. P. 397-410. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.025>

16 de Hoogh I.M., van der Kamp J.W., Wopereis S. The potential of personalized nutrition for improving wholegrain consumption. Journal of Cereal Science. 2022. Vol. 107. Art. ID 103505. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103505>

17 Semjonov P.N. Pishhevaja cennost' hleba iz smesi rzhanoj i pshenichnoj muki. Mater. mezhdunar. nauchno-praktich. konf., posvjashh. 100-letiju Gorskogo GAU «Nauchnoe obespechenie ustojchivogo razvitiya agropromyshlennogo kompleksa gornyh i predgornyh territorij». Vladikavkaz: Gorskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2018. Tom 2. S. 152-154.

18 Kalmykova O.V., Martynenko D.V. Ispol'zovanie rastitel'nyh dobavok s cel'ju povyshenija pishhevoj cennosti i fiziologicheskoy znachimosti hlebobulochnyh izdelij. Mater. mezhdunar. nauchno-praktich. konf., posvjashh. 75-letiju okonchanija Stalingskogo bitvy «Mirovye nauchno-tehnologicheskie tendencii social'no-jekonomicheskogo razvitiya apk i sel'skih territorij». Volgograd: Volgogradskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2018. Tom 2. S. 75-80. <https://elibrary.ru/item.asp?id=35401240>

19 Rusakova N.A., Vlasova V.N. Primenenie rastitel'nogo syr'ja dlja povyshenija pishhevoj cennosti hleba. Paradigma. 2018. №1. S. 10-17. <https://elibrary.ru/item.asp?id=42917577> Dhen N., Rejeb I.B., Boukhris H., Damergi C., Gargouri M. Physicochemical and sensory properties of wheat- Apricot kernels composite bread. LWT. 2018. Vol. 95. P. 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.068>

20 Torbica A., Radosavljević M., Belović M., Djukić N., Marković S. Overview of nature, frequency and technological role of dietary fibre from cereals and pseudocereals from grain to bread. Carbohydrate Polymers. 2022. Vol. 290. Art. ID 119470. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119470>

21 Dhen N., Rejeb I.B., Boukhris H., Damergi C., Gargouri M. Physicochemical and sensory properties of wheat- Apricot kernels composite bread // LWT. – 2018. – Vol. 95. – P. 262-267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.068>

22 Al'shakova E.A. Ispol'zovanie hleba funkcional'nogo naznachenija dlja obespechenija polnocennogo pitaniya naselenija. Sbornik nauch. statej VII Mezhdunar. nauchno-praktich. konf. «Novye konceptual'nye podhody k resheniju global'noj problemy obespechenija prodovol'stvennoj bezopasnosti v sovremennyh uslovijah». Kursk: Jugo-Zapadnyj gosudarstvennyj universitet, 2020. S. 31-34. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44308426>

23 Boukid F., Zannini E., Carini E., Vittadini E. Pulses for bread fortification: A necessity or a choice? Trends in Food Science and Technology. 2019. Vol. 88. P. 416-428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.007>

24 Gallo V., Romano A., Ferranti P., D'Auria G., Masi P. Properties and in vitro digestibility of a bread enriched with lentil flour at different leavening times. Food Structure. 2022. Vol. 33. Art. ID 100284. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100284>

25 Vishwakarma S., Dalbhagat C.G., Mandliya S., Mishra H.N. Investigation of natural food fortificants for improving various properties of fortified foods: A review. Food Research International. 2022. Vol. 156. Art. ID 111186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111186>

26 Shpis A.A., Musrepova S.A. Hlebnyj rynek Kazahstana i novyj vid hleba. Mater. II Vseros. (nac. nauchno-praktich. konf. s mezhdunar. uchastiem) «Sovremennye problemy finansovogo regulirovaniya i ucheta v agropromyshlennom komplekse». Lesnikovo: Kurganskaja gosudarstvennaja sel'skohozjajstvennaja akademija im. T.S. Mal'ceva, 2018. S. 636-639. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=35044201>

27 Canesin M.R., Betim Cazarin C.B. Nutritional quality and nutrient bioaccessibility in sourdough bread. Current Opinion in Food Science. 2021. Vol. 40. P. 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.007>

28 Suo B., Chen X., Wang Y. Recent research advances of lactic acid bacteria in sourdough: origin, diversity, and function. *Current Opinion in Food Science*. 2021. Vol. 37. P. 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.007>

29 Bartkiene E., Jakobsone I., Juodeikiene G., Vidmantiene D., Pugajeva I., Bartkevics V. Effect of fermented *Helianthus tuberosus* L. tubers on acrylamide formation and quality properties of wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*. 2013. Vol. 54, Issue 2. P. 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.015>

30 Rodriguez-Ramiro I., Brearley C.A., Bruggaber S.F.A., Perfecto A., Shewry P., Fairweather-Tait S. Assessment of iron bioavailability from different bread making processes using an in vitro intestinal cell model. *Food Chemistry*. 2017. Vol. 228. P. 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.130>

31 Arora K., Ameer H., Polo A., Di Cagno R., Rizzello C.G., Gobbetti M. Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science and Technology*. 2021. Vol. 108. P. 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008>

32 Reale A., Di Stasio L., Di Renzo T., De Caro S., Ferranti P., Picariello G., Addeo F., Mamone G. Bacteria do it better! Proteomics suggests the molecular basis for improved digestibility of sourdough products. *Food Chemistry*, Volume. 2021. Vol. 359. Art. ID 129955. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129955>

33 Pétel C., Onno B., Prost C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2017. Vol. 59. P. 105-123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.015>

34 Warburton A., Silcock P., Eyres G.T. Impact of sourdough culture on the volatile compounds in wholemeal sourdough bread. *Food Research International*. 2022. Vol. 161. Art. ID 111885. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111885>

35 Lappi J., Mykkänen H., Kolehmainen M., Poutanen K. Wholegrain foods and health. In: Delcour J.A., Poutanen K. (Eds.) *Fibre-Rich and Wholegrain Foods. Improving Quality*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Oxford, Cambridge, Philadelphia, New Delhi: Woodhead Publishing, 2013. P. 76-95. <https://doi.org/10.1533/9780857095787.1.76>

36 Gordon D.T., Wrigley C. Whole-grain versus refined products. In: *The Encyclopedia of Grain Science*. Cambridge: Academic Press, 2004. P. 424-429.

37 Parenti O., Guerrini L., Zannoni B. Techniques and technologies for the breadmaking process with unrefined wheat flours. *Trends in Food Science and Technology*. 2020. Vol. 99. P. 152-166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.034>

38 Ma S., Wang Z., Guo X., Wang F., Huang J., Sun B., Wang X. Sourdough improves the quality of whole-wheat flour products: Mechanisms and challenges—A review. *Food Chemistry*. 2021. Vol. 360, Art. ID 130038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130038>

39 Parenti O., Guerrini L., Cavallini B., Baldi F., Zannoni B. Breadmaking with an old wholewheat flour: Optimization of ingredients to improve bread quality. *LWT*. 2020. Vol. 121. Art. ID 108980. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108980>

40 Heiniö R.L., Noort M.W.J., Katina K., Alam S.A., Sozer N., de Kock H.L., Hersleth M., Poutanen K. Sensory characteristics of wholegrain and bran-rich cereal foods – A review. *Trends in Food Science and Technology*. 2016. Vol. 47. P. 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.002>

41 Cizeikiene D., Jagelaviciute J., Stankevicius M., Maruska A. Thermophilic lactic acid bacteria affect the characteristics of sourdough and whole-grain wheat bread. *Food Bioscience*. 2020. Vol. 38. Art. ID 100791. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100791>

42 Ripari V., Gänzle M.G., Berardi E. Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 232. P. 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.025>

43 Oshiro M., Zendo T., Nakayama J. Diversity and dynamics of sourdough lactic acid bacteria created by a slow food fermentation system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2021. Vol. 131, Issue 4. P. 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.11.007>

44 Ogunremi O.R., Banwo K., Sanni A.I. Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: trends in selection and application. *Current Opinion in Food Science*. 2017. Vol. 13. P. 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.003>

45 Albagli G., do Monte Schwartz I., Amaral P.F.F., Ferreira T.F., Finotelli P.V. How dried sourdough starter can enable and spread the use of sourdough bread. *LWT*. 2021. Vol. 149. Art. ID 111888. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111888>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.25.39

К.О. КАРАМЕНДИН^{1*}, А.И. КЫДЫРМАНОВ¹, А.А. АБИШОВ²,
Ж.Ж. КУМЕКБАЕВА³, М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Научно-производственный центр Диавак-АБН, Алматы, Казахстан

³Эквилаб, Алматы, Казахстан

⁴Научно-производственный центр Антиген, Алматинская обл., Казахстан

*e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

ГЕРПЕСВИРУСЫ ЛОШАДЕЙ EHV-1 И EHV-4 В КАЗАХСТАНЕ

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.03

Аннотация

В статье представлены современные сведения о герпесвирусах, вызывающих ринопневмонию у лошадей. Приводятся данные о клинических проявлениях болезни, методах диагностики и вакцинопрофилактики. Приведены результаты серологических исследований в ИФА поголовья лошадей Алматинской области - найдены антитела как к EHV-1, так и к EHV-4. Разработанная тест-система для ПЦР позволяет эффективно диагностировать ринопневмонию у лошадей в коневодческих хозяйствах Казахстана. Полногеномное секвенирование местного штамма EHV-1 показало изменения в геноме после аттенуирования штамма методом многократных пассажей в культуре клеток.

Ключевые слова: герпесвирус, EHV-1, EHV-4, ринопневмония, Казахстан, лошадь, диагностика, клиника, вакцина, секвенирование.

Вирусы герпеса лошадей (EHV), представляют собой высококонтагиозные вирусы, вызывающие заболевания верхних дыхательных путей, неврологические заболевания, аборт и/или неонатальную смерть. [1,2]. Ринопневмония лошадей (РПЛ) – это исторически сложившееся общее название заболевания, вызываемого двумя ДНК-вирусами из семейства *Herpesviridae*: *Equid herpesvirus-1* и *Equid herpesvirus-4* (EHV-1 и EHV-4) [3]. Оба вируса относятся к роду *Alphaherpesvirus* и их геномы от 55% до 84% идентичны по нуклеотидному составу, а по аминокислотному сходство составляет до 96% [4,5]. На сегодняшний день EHV-1 и EHV-4 классифицированы как представители подсемейства *Alphaherpesvirinae* рода *Varicellovirus* [6].

В семействе лошадиные идентифицированы восемь герпесвирусов, из которых пять принадлежат к подсемейству *Alphaherpesvirinae* и три - к *Gammapherpesvirinae*. Лошади являются природными хозяевами для *Alphaherpesvirus* типов 1 (EHV-1), 3 (EHV-3, коитальная экзантема), 4 (EHV-4), *Gammapherpesvirus* типов 2 (EHV-2) и 5 (EHV-5). Недавно был описан вариант EHV-1, возникший в результате одной точечной мутации в гене вирусной ДНК-полимеразы и ассоциирующийся с неврологическим заболеванием - лошадиной герпесной миелозэнцефалопатией (EHM). Изоляция нового нейротропного вируса EHV-9 [7] от газели (*Gazelle herpesvirus-1*) указывает на то, что список известных на сегодняшний день герпесвирусов лошадиных еще может пополниться. EHV-1 и EHV-4 клинически, эпизоотически и экономически наиболее значимые патогены для лошадей.

Эпизоотология. Ринопневмония лошадей широко распространена во многих странах мира. В хозяйствах EHV-1 встречается чаще (>60%) по сравнению с EHV-4, инфекция после острого течения у животных принимает характер затяжной латентной

инфекции. Происходит чередование внезапных острых течений с периодами атипичного протекания болезни. Также характерна сезонность: чаще вспышки происходят осенью и в начале зимы.

Патогенез. Латентность альфагерпесвирусов – важная вирусная стратегия, которая обеспечивает ему выживание и распространение внутри популяции лошадей [8]. На сегодняшний день ясно, что латентно инфицированные лейкоциты не распознаются иммунной системой хозяина. EHV-1 персистирует преимущественно в Т-лимфоцитах CD5+/CD8+ и активируется интерлейкином-2 и лошадиным хорионическим гонадотропином [9]. Предполагается, что реактивированный латентный вирус, выделяемый с носовыми истечениями, играет ключевую роль в эпизоотологии EHV-1 и EHV-4. Физиологические факторы, ответственные за реактивацию пока неизвестны, но установлено, что спонтанное выделение вируса следует за такими стресс-факторами как отъем, кастрация, перемещение животного и ремитирующие болезни [10].

Клиника. При заражении взрослых животных инкубационный период составляет 2-8 сут. У больных животных повышается температура тела до 39,5–40 °С, наблюдаются конъюнктивит, серозный ринит, учащенное дыхание и сердцебиение. Частый признак болезни - отечность тазовых конечностей или подгрудка. При инфицировании вирусом EHV-1 жеребые кобылы абортируют во второй половине жеребости на 7-10-м мес. В некоторых случаях выкидыши происходят у 90 % кобыл.

Вакцинопрофилактика. В настоящее время стратегия вакцинации направлена на профилактику заболеваемости среди жеребят-сосунков, так как именно они считаются основным резервуаром и фактором трансмиссии вирусов ринопневмонии [11]. Существуют, по крайней мере, 12 моно- и поливалентных вакцин к EHV-1 и EHV-4. Только одна из них лицензирована в Евросоюзе: инактивированная EHV-1 и EHV-4 вакцина, содержащая адъювант карбомер и обеспечивающая профилактику абортов, вызываемых EHV-1 [12]. В России и Казахстане для специфической профилактики используют живую вирус-вакцину против ринопневмонии из штамма CB/69. Вакцинацию проводят двукратно с интервалом 3–4 мес. Жеребых кобыл иммунизируют на 2-3-м мес жеребости, повторно на 6-7-м мес. В последнее время разрабатываются живые генно-инженерные вакцины [13], однако при испытании их иммуногенность пока оказывается невысокой.

Наиболее эффективной является вакцина, полученная методом классического мутагенеза *in vitro*, которая кроме респираторной формы и абортов при EHV-1, также защищает от EHV-4, при этом вводится только однократно интраназально [14]. В Казахстане разрабатывается собственная вакцина на основе аттенуированного штамма, вызвавшего массовые аборты на юго-востоке страны [15].

Диагностика. Для изоляции вируса из биологических образцов используют первичные культуры клеток почки эмбриона лошади (ЕЕК) или линии фибробластов, полученные из эпидермальной и легочной тканей животных. Дальнейшую идентификацию вируса проводят в реакции иммунофлуоресценции с использованием меченых моноклональных антител [16]. При гистологическом исследовании патматериала в виде парафинизированных образцов используется иммунопероксидазное окрашивание с обнаружением вируса под световым микроскопом. Одновременно можно наблюдать характерные морфологические изменения в тканях [17].

Серологическая диагностика основана на выявлении прироста титров антител при исследовании парных сывороток, взятых во время острого периода заболевания и в стадии реконвалесценции (через 2–4 недели). Антитела в сыворотках крови также можно определить в реакциях связывания комплемента и ИФА [18].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) используется для быстрой амплификации и обнаружения нуклеиновых кислот вирусов ринопневмонии в клинических образцах, парафинизированных тканях и культурах клеток. Наблюдается высокая степень корреляции между результатами ПЦР и изоляцией вируса в культурах клеток при диагностике EHV-1 или EHV-4 [19]. Однако при интерпретации результатов ПЦР следует учитывать

присутствие вируса в некоторых тканях при латентной инфекции [20]. МЭБ рекомендует гнездовой ПЦР для обнаружения EHV-1 или EHV-4 в клинических или патологических материалах [21]. В лаборатории экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии разработана собственная тест-система на основе ПЦР для одновременной дифференциальной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей [22].

Материалы и методы

Для серологических исследований использовали тест-систему на основе модифицированного Crabb and Studdert (1993) метода ИФА, для диагностики герпесвирусов лошадей фирмы «Svanova Biotech AB» (Швеция), основанной на использовании рекомбинантных белков EHV1 и EHV4 - “Eguine Herpes Virus type 1 and 4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab)”, которая позволяет распознавать инфицированных лошадей от неинфицированных EHV1 и EHV4 животных.

Для молекулярной диагностики использовали собственную тест-систему на основе ПЦР для одновременной дифференциальной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей. Для ПЦР был выбран консервативный участок генома EHV-4 – ген поверхностной мембраны gB, который имеет 89,6% идентичность с соответствующим геном EHV-1 [8] и в компьютерной программе OligoAnalyser разработаны праймеры.

Для выделения герпесвирусов лошадей материалы от больных животных использовались для заражения перевиваемой культуры клеток трахеи телят (ККТТ). Выделенный штамм ринопневмонии лошадей АК-2011 размножали и накапливали в ККТТ в титре 5,75 lg TCID₅₀/см³ и выше (титр цитопатических доз, вызывающих клеточное повреждение монослоя у 50% инфицированных). Цитопатогенное действие вируса проявлялось в монослое инфицированных клеток через 72–90 часов после инокуляции и распространялось на более чем 85% клеточного монослоя через 110–144 часа после инфицирования.

Для секвенирования нового поколения вирусную ДНК выделяли с помощью набора QIAmp Viral RNA Mini (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Библиотеку получали с помощью набора ДНК NEBNext Ultra (NEB, США) и качество библиотеки оценивали с помощью Agilent 2100 (Agilent, Германия). Секвенирование проводили на приборе MiSeq с использованием набора v.3 (Illumina, США). Программное обеспечение FastQC [23] использовалось для оценки качества прочтений. Полученные прочтения были обрезаны на 3' и 5'-концах. Для сборки de Novo использовали ассемблер SPAdes [24] в составе программного пакета Geneious Prime (Biomatters, Новая Зеландия) [25].

Результаты и обсуждение

В Казахстане вирусы ринопневмонии лошадей часто циркулируют в хозяйствах, где не проводятся профилактические мероприятия. Так, с 2000 по 2007 гг. в Алматинской области регулярно изолируются вирусы ринопневмонии на первично-трипсинизированных культурах клеток почки эмбриона лошади. При серологическом исследовании в ИФА найдены антитела как к EHV-1, так и к EHV-4 [26].

При помощи “Eguine Herpes Virus type 1 and 4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab)” были проанализированы сыворотки крови от 30 кобыл одного из хозяйств Алматинской области Казахстана, в котором ежегодно регистрировались случаи абортов кобыл на последних месяцах жеребости, а также случаи рождения нежизнеспособных жеребят, погибающих в первые часы жизни. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 -Дифференциация антител к EHV1/EHV4 и EHV4 в сыворотках лошадей в ELISA-EHV1/EHV4-Ab тесте фирмы «Svanova Biotech AB» (Швеция).

№ лошади	EHV1/EHV4	EHV4	№ лошади	EHV1/EHV4	EHV4
1	-	+	16	-	+
2	+	+	17	+	+
3	-	+	18	+	+
4	-	+	19	-	+
5	-	+	20	-	+
6	+	+	21	+	+
7	-	+	22	-	+
8	-	+	23	-	+
9	-	+	24	-	+
10	-	+	25	-	+
11	-	+	26	-	+
12	-	+	27	-	+
13	-	+	28	-	+
14	+	+	29	-	+
15	+	+	30	+	+

Все исследованные лошади имели антитела к EHV4. 27% этих животных также имели антитела к EHV1. Полученные результаты свидетельствуют о циркуляции в данном поголовье двух типов герпесвирусов лошадей - EHV1 и EHV4. Распространению инфекции способствовало скученное содержание животных, отсутствие регулярной вакцинации, несоблюдение карантинных мероприятий при ввозе в данное хозяйство вновь прибывающих лошадей, а также при перемещении животных внутри хозяйства. На основании полученных результатов, кобылы, имеющие антитела к EHV1 были отделены от остальных животных, а из оставшегося поголовья лошадей, имеющих антитела к EHV4, были сформированы небольшие группы. В данных подгруппах лошадей регулярно проводится изучение иммунного фона к герпесвирусным инфекциям на основании исследования сывороток животных в иммуноферментном тесте фирмы «Svanova Biotech AB». Это позволяет, по полученным результатам ИФА, отделять серонегативных животных от серопозитивных, не допуская их контакта, тем самым предотвращать дальнейшую циркуляцию герпесвирусов лошадей и снизить количество аборт в данном хозяйстве.

В лаборатории экологии вирусов разработана собственная тест-система на основе ПЦР для одновременной дифференциальной диагностики гриппа и ринопневмонии лошадей. Проведено выравнивание гена gB с аналогичными последовательностями из международной базы данных Генбанк и определены консервативные участки для конструирования праймеров. В результате исследований чувствительности ПЦР-набора установлено, что отдельно с ДНК вируса ринопневмонии лошадей тест-система работает до 10–5 разведения (25 пикограмм), что сопоставимо с международными требованиями, предъявляемыми к чувствительности ПЦР (рисунок 1). Данная тест-система позволяет эффективно диагностировать ринопневмонию у лошадей в коневодческих хозяйствах.



Рисунок 1 – Чувствительность ПЦР тест-системы при разведении исходных образцов до 10-5 разведения

В 2011 г. произошла вспышка ринопневмонии лошадей в Казахстане в одном из хозяйств юго-востока Казахстана, в котором ежегодно регистрировались аборт жеребых, рождение нежизнеспособных жеребят, погибающих в течение первых 12 часов жизни. В настоящей статье в Казахстане описывается молекулярно-генетическая характеристика выделенного изолята и приводится строение его полного генома. В результате секвенирования полученные прочтения были собраны *de Novo* и картированы на эталонной последовательности генома EHV-1 (рисунок 2).

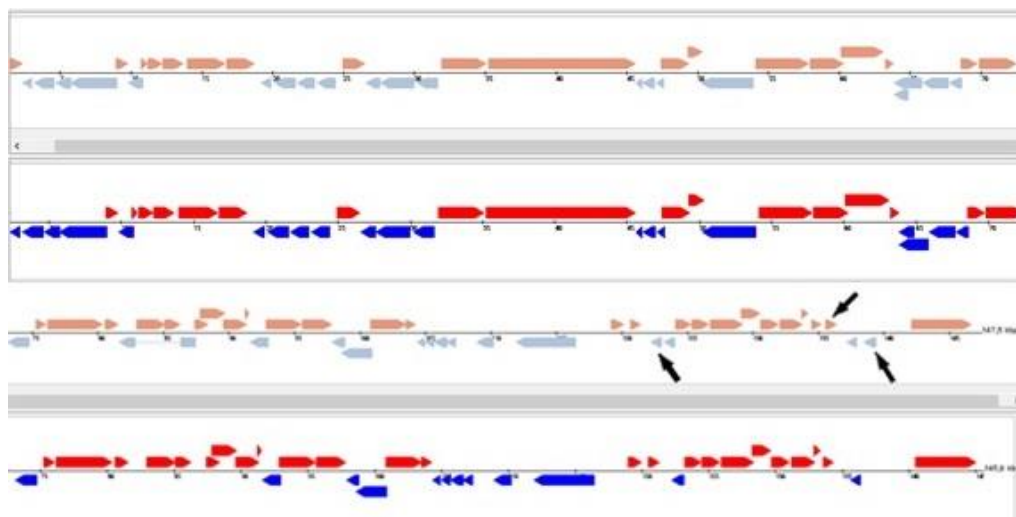


Рисунок 2 – Схема аннотации генома казахстанского штамма EHV-1

Анализ геномов вирусов ринопневмонии методом секвенирования показал, что у EHV-1 он состоит из 150 223, а у EHV-4 из 145 597 пар оснований. У обоих вирусов они условно разделены на длинный уникальный регион, фланкированный коротким инвертированным повтором, и короткий уникальный регион, фланкированный основным инвертированным повтором, и состоят из 76 открытых рамок считывания [27]. В нашем предварительном исследовании определено, что полный геном местного штамма ринопневмонии составил более 145000 нуклеотидов и состоит из 74 открытых рамок считывания. При аттенуировании штамма методом многократных пассажей через клеточную культуру, очевидно, вирус потерял три открытых рамки считывания (на рисунке 2 показаны стрелками).

Заключение

В Казахстане вирусы ринопневмонии остаются актуальными вирусными инфекциями, наносящими значительный урон коневодству. При серологическом исследовании в ИФА найдены антитела как к EHV-1, так и к EHV-4 при обследовании поголовья лошадей Алматинской области. Полученные результаты ИФА позволили отделить серонегативных животных от серопозитивных, не допуская их контакта, тем самым предотвратить дальнейшую циркуляцию герпесвирусов лошадей и снизить количество абортов. Разработанная тест-система для ПЦР позволяет эффективно диагностировать ринопневмонию у лошадей в коневодческих хозяйствах Казахстана. Полное секвенирование генома местного штамма EHV-1 в дальнейшем расширит понимание биологии этих вирусов и откроет дополнительные возможности для иммунопрофилактики.

Как правило, значительное количество абортов, вызванных вирусом, связано с отсутствием рутинных диагностических тестов, низким уровнем вакцинации, неконтролируемым ввозом лошадей, снижением резистентности к вирусу в зимне-весенний период и длительной выживаемостью патогена в окружающей среде [28].

Финансирование

Работа выполнена в рамках НТП BR10764975 «Разработать и предложить для производства методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных и обеззараживания почвенных сибиреязвенных очагов» Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Литература:

- 1 World Organization of Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 12.8. Infection with Equid Herpesvirus-1 (Equine Rhinopneumonitis). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_equine_rhinopneumonitis.pdf
- 2 Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D. & Smith K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: Infectious Diseases of Livestock, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
- 3 Bryans J.T. & Allen G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. In: Herpesvirus Diseases of Animals, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
- 4 Cullinane, A. A., Rixon, F. J. & Davison, A. J. (1988). Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. Journal of General Virology 69, 1575–1590.
- 5 Telford E.A.R., Watson M.S., McBride K. & Davison A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. Virology, 189, 304–316.
- 6 Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. Arch. Virol. 154, 171–177.
- 7 Fukushi, H., Tomita, T., Taniguchi, A., Ochia, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T., Hirai, K., 1997. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. Virology 226, 34–44.
- 8 Whitley, R.J., Gnann, J.W., 1993. The epidemiology and clinical manifestation of herpes simplex virus infections. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopaz, C. (Eds.), The Human Herpesviruses. Raven Press, New York, pp. 69–105.
- 9 Smith, D.J., Iqbal, J., Purewal, A., Hamblin, A.S., Edington, N., 1998. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD+5/CD8+ leukocytes indirectly by IL2 or chorionic gonadotrophin. Journal of General Virology 24, 2997–3004.
- 10 Burrows, R., Goodridge, D., Denyer, M.S., 1984. Trials of an inactivated equid herpesvirus-1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. Veterinary Record 114, 369–374.
- 11 Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., 2002. Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine. Veterinary Microbiology 88, 13–25.
- 12 Heldens, J.G.M., Hannant, D., Cullinane, A.A., Prendergast, M.J., Mumford, J.A., Nelly, M., Kydd, J.H., Weststrate, M.W., Van Den Hoven, R., 2001. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV-1 and EHV-4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. Vaccine 19, 4307–4317.
- 13 Kaashoek, M., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F.A.M., Quak, J., Gielkens, A.L.J., Van Oirschot, J.T., 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. Vaccine 12, 439–444.
- 14 Patel, J.R., Földi, J., Bateman, H., Williams, J., Didlick, S., Stark, R., 2003b. Equid herpesvirus (EHV-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory diseases following EHV types 1 and 4 challenges. Veterinary Microbiology 92, 1–17.
- 15 Abisheva A, Abishov A, Khairullaeva K, Shynybayev K, Kalissynov B, Maikhin K, Kydyrmanov A, Karamendin K, Valdovska A, Syrym N. 2022. AK-2011 strain for the development of a vaccine against equine rhinopneumonitis. Transbound Emerg Dis. 00:1-10. <https://doi.org/10.1111/tbed.14531>
- 16 Gunn H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. Irish Vet. J., 44, 37–40.

17 Schultheiss P.C., Collins J.K. & Carman J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 12–15.

18 Dutta S.K., Talbot N.C. & Myrup A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 1930–1934.

19 Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C.A., Studdert M.J. & Drummer H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, 79, 563–569.

20 Welch H.M., Bridges C.G., Lyon A.M., Griffiths L. & Edington N. (1992). Latent equine herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.*, 73, 261–268.

21 Borchers K. & Slater J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, 45, 331–336.

22 Karamendin K.O., Kydyrmanov A.I., Sayatov M.Kh. Development of a PCR for the simultaneous diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. *Biotechnology. Theory and Practice*. No. 1, 2013 pp. 20-23

23 Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

24 Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, & Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70:e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

25 Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

26 Kumekbayeva Zh.Zh. Indication, identification of equine herpesviruses, differentiation of EHV1-EHV4 in ELISA test «Svanova Biotech AB». Proceedings of the 6th REVA Conference «Equine Diseases: Diagnosis, Prophylaxis, Treatment», Moscow, Russia, 2005, p.5.

27 Telford E.A.R., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A. & Davison A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, 79, 1197–1203.

28 Castro ER, Arbiza J. Detection and genotyping of equine herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev Sci Tech*. 2017 Dec;36(3):799-806. doi: 10.20506/rst.36.3.2715.

К.О. ҚАРАМЕНДИН^{1*}, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹, А.А. ӘБШОВ², Ж.Ж. КӨМЕКБАЕВА³,
М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴

¹ Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

² Diavak-ABN ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

³ Equilab, Алматы, Қазақстан

⁴ «Антиген» ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы облысы, Қазақстан

*e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ЕHV-1 ЖӘНЕ ЕHV-4 ЖЫЛҚЫЛАР ГЕРПЕСВИРУСТАРЫ

Түйін

Мақалада жылқылар ринопневмониясы ауруын қоздыратын герпесвирустар жөнінде қазіргі заманның мәліметтері беріледі. Аурудың клиникалық көріністері, балау және вакцинамен алдын алу әдістері жөнінде мәліметтер беріледі. Алматы облысы жылқылары ИФА әдісімен серологиялық зерттеулер өткізілді – ЕHV-1 және ЕHV-4 қарсы антиденелер табылды. Өзірленген ПТР тест жүйесі Қазақстанның жылқы шаруашылығында жылқылардың ринопневмониясын балауға мүмкіндік береді. Жергілікті ЕHV-1 штаммының толық геномын секвендеу, жасуша культурасынан бірнеше рет өткізу әдісімен әлсірегені геномындағы өзгерістерді көрсетті.

Кілт сөздер: герпесвирус, ЕHV-1, ЕHV-4, ринопневмония, ат, балау клиника, вакцина, секвендеу.

IRSTI: 34.25.39

K.O. KARAMENDIN^{1*}, A.I. KYDYRMANOV¹, A.A. ABISHOV²,
Zh.Zh. KUMEKBAYEVA³, M.N. AKHMETZHANOVA⁴

¹Scientific and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

² SPE DiaVak-ABN, Almaty, Kazakhstan

³ EquiLab, Almaty, Kazakhstan

⁴ Antigen, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: kobey.karamendin@gmail.com

EQUINE HERPESVIRUSES EHV-1 AND EHV-4 IN KAZAKHSTAN

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.03

Abstract

Contemporary data on equine herpesviruses causing rhinopneumonitis in horses are present in this paper. Data on clinical manifestations, methods of diagnosing and vaccine prophylaxis are given. The results of serological studies of the population of horses in the Almaty region in ELISA are presented - antibodies were found both to EHV-1 and EHV-4. The developed PCR makes it possible to effectively diagnose rhinopneumonitis in horse breeding farms in Kazakhstan. Whole genome sequencing of the local strain EHV-1 showed changes in the genome after strain attenuation after multiple passages in cell culture.

Keywords: herpesvirus, EHV-1, EHV-2, rhinopneumonitis, horse, diagnostics, clinics, vaccine, sequencing

Equine herpesviruses (EHV) are highly contagious viruses that cause upper respiratory disease, neurological disease, abortion and/or neonatal death. [1,2]. Equine rhinopneumonitis is the historically common name for a disease caused by two DNA viruses from the *Herpesviridae* family: Equid herpesvirus-1 and Equid herpesvirus-4 (EHV-1 and EHV-4) [3]. Both viruses belong to the genus *Alphaherpesvirus* and their genomes are from 55% to 84% identical in nucleotide composition, and in amino acid - the similarity is up to 96% [4,5]. To date, EHV-1 and EHV-4 are classified as members of the *Alphaherpesvirinae* subfamily of the genus *Varicellovirus* [6].

In the *Equidae* family, eight herpesviruses have been identified, of which five belong to the *Alphaherpesvirinae* subfamily and three to the *Gammaherpesvirinae* subfamily. Horses are natural hosts for *Alphaherpesvirus* types 1 (EHV-1), 3 (EHV-3, coital exanthema), 4 (EHV-4), *Gammaherpesvirus* types 2 (EHV-2) and 5 (EHV-5). A variant of EHV-1 has recently been described, resulting from a single point mutation in the viral DNA polymerase gene, and associated with the neurological disease Equine herpes myeloencephalopathy (EHM). The isolation of the new neurotropic virus EHV-9 [7] from the gazelle (*Gazelle herpesvirus-1*) indicates that the list of currently known equine herpesviruses may still be complemented. EHV-1 and EHV-4 are clinically, epizootically and economically the most significant pathogens for horses.

Epidemiology. Equine rhinopneumonitis is widespread all over the world. In horse populations, EHV-1 infection is supposed to occur at a higher (>60%) frequency compared to EHV-4. Equine rhinopneumonitis, having arisen in a horse breeding farm, become a stationary infection. Acute outbreaks alternate with periods of an obscure, atypical course of the disease. In affected herds, the virus persists due to the ability to survive for a long time in the organism of horses, the universality of the transmission mechanism and the short duration of post-infection immunity. In addition, equine rhinopneumonitis is characterized by seasonality - the largest number of sick animals is registered in autumn and early winter.

Pathogenesis. The latency of alphaherpesviruses is an important viral strategy that ensures its survival and distribution within the horse population [8]. To date, it is clear that latently infected leukocytes are not recognized by the host's immune system. EHV-1 persists predominantly in CD5+/CD8+ T-lymphocytes and is activated by interleukin-2 and equine chorionic gonadotropin

[9]. It is assumed that reactivated latent virus excreted with nasal discharge plays a key role in the epidemiology of EHV-1 and EHV-4. The physiological factors responsible for reactivation are not yet known, but spontaneous viral shedding has been shown to follow stress factors such as weaning, castration, animal movement, and remittent diseases [10].

Clinics. When adult animals are infected, the incubation period is 2-8 days. In sick animals, the body temperature rises to 39.5-40 °C, conjunctivitis, serous rhinitis, rapid breathing and palpitation are observed. A common symptom of the disease is swelling of the pelvic limbs or dewlap. When infected with the EHV-1 virus, pregnant mares are aborted in the second half of pregnancy at the 7-10th month. In some cases, abortions occur in 90% of mares. In the period preceding the abortion, the mares have no visible signs of the disease, the normal development of pregnancy continues. Abortions occur suddenly without noticeable precursors or dead foals are born. An important step in understanding the pathogenesis of rhinopneumonitis is to define that necrotizing vasculitis and thrombosis due to lysis of endothelial cells lining the capillaries of the CNS, the fertilized uterus and other organs of the horse are the main factors causing abortions and paresis.

Vaccination. Currently, the vaccination strategy is aimed at preventing morbidity among suckling foals, since they are considered the main reservoir and transmission factor of EHV [11]. There are at least 12 mono- and polyvalent vaccines for EHV-1 and EHV-4. All of them are intended for parenteral administration and serve to prevent the respiratory form of the disease. Only one of them is licensed in the European Union: an inactivated EHV-1 and EHV-4 vaccine containing a carbomer adjuvant and providing the prevention of abortions caused by EHV-1 [12]. In Russia and Kazakhstan, a live vaccine from the SV/69 strain is used. Vaccination is carried out twice with an interval of 3-4 months. Pregnant mares are immunized at the 2-3rd month of pregnancy, again at the 6-7th month. Young animals are first vaccinated at the age of 3-4 months. For their passive immunization, hyperimmune antiserum is used, but it does not have a protective effect during abortion. Recently, live genetically engineered vaccines have been developed [13], however, during testing, their immunogenicity was found to be low. Testing of another recombinant vaccine, using the Canarypox virus as a vector expressing EHV-1 gB, gC, and gD proteins, provided only partial protection of horses from the respiratory form. In the USA, the vaccines with the greatest ability to limit nasal shedding and viremia of the neuro virulent strain include the vaccines licensed for control of abortion (Pneumabort-K & Prodigy), Calvenza and the MLV vaccine (Rhinomune) [14].

The most effective was the vaccine obtained by classical in vitro mutagenesis, which, in addition to the respiratory form and abortions in EHV-1, also protects against EHV-4, while being administered only once intranasally [15]. Another important characteristic of this live vaccine is its ability to confer immunity to EHV-1 and EHV-4 in suckling foals via mother's milk [16]. Kazakhstan is developing its own vaccine based on an attenuated strain that caused mass abortions in the southeast of the country [17].

Diagnostics. To isolate the virus from samples, primary cultures of equine embryonic kidney (EEK) cells or fibroblast lines obtained from epidermal and lung tissues of animals were used. Virus identification was carried out in an immunofluorescence assay using labeled monoclonal antibodies. Frozen sections [18] can be investigated using this method.

In the histological examination of the pathological material in the form of paraffinized samples, immunoperoxidase staining is used with the detection of the virus under a light microscope. At the same time, specific morphological changes in tissues can be observed [19].

Serological diagnosis is based on the detection of an increase in antibody titers in the study of paired sera taken during the acute period of the disease and in the convalescence stage (after 2-4 weeks). The limiting antibody titer in the neutralization assay is considered to be the highest dilution of serum, which 100% prevents infection of the cell monolayer from the cytopathic effect of the virus [20]. Serum antibodies can also be detected by Complement Fixation Test and ELISA [21], the advantages of which are that these methods provide faster results and do not require cell cultures. During an outbreak of infection, antibodies to EHV1 and EHV4 were detected, which

can be differentiated using the ELISA, which allows not only to speed up the diagnosis, but also to take timely measures to combat this disease.

Polymerase chain reaction (PCR) is used for the rapid amplification and detection of nucleic acids of EHV in clinical specimens, paraffinized tissues and cell cultures. There is a high degree of correlation between PCR results and virus isolation in cell cultures in the diagnosis of EHV-1 or EHV-4 [22]. However, when interpreting PCR results, the presence of the virus in some tissues during latent infection should be considered [23]. The OIE recommends nested PCR for the detection of EHV-1 or EHV-4 in clinical or pathological specimens [24]. The Laboratory of Ecology of Viruses of the Scientific and Production Center for Microbiology and Virology has developed its own PCR-based test for the simultaneous differential diagnosis of influenza and equine rhinopneumonitis [25].

Materials and Methods

For serological studies, an ELISA kit based on the modified Crabb and Studdert (1993) method was used, for the diagnosis of equine herpesviruses (Svanova Biotech AB, Sweden), based on the use of recombinant proteins EHV1 and EHV4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab). This test allows to distinguish infected horses from non-infected EHV1 and EHV4 animals, monitor the immune background of horses to herpesvirus infections and manage possible outbreaks of abortions in pregnant mares.

For molecular diagnostics, we used our own PCR-based kit for the simultaneous differential diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. The compatibility of the primers with each other was checked in the OligoAnalyser software. For PCR, a conservative region of the EHV-4 genome, the gB surface membrane gene, was chosen, which has 89.6% identity with the corresponding EHV-1 gene [8].

To isolate equine herpesviruses, samples from sick animals were used to infect a calf tracheal cell line. The isolated strain of equine rhinopneumonitis AK-2011 was propagated and accumulated at a titer of $5.75 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ and higher (the titer of cytopathic doses that cause cell damage to the monolayer in 50% of the infected). The cytopathogenic effect of the virus was manifested in the monolayer of infected cells 72-90 hours after inoculation and spread to more than 85% of the cell monolayer 110-144 hours after infection.

Next Generation Sequencing. Viral DNA was extracted using the QIAmp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol. The library was obtained using the NEBNext Ultra DNA kit (NEB, USA) and the quantity of the library was assessed using Agilent 2100 (Agilent, Germany). Paired-end sequencing was performed on a MiSeq instrument using v.3 kit (Illumina, USA). FastQC [26] software was used to assess the quality reads. The obtained reads were trimmed at the 3' and 5' ends. SPAdes assembler [27] within the Geneious Prime software package (Biomatters, New Zealand) [28] was used for de Novo assembly.

Results and Discussion

In Kazakhstan, EHV circulates in farms where preventive measures are not taken. Thus, from 2000 to 2007 in the Almaty region, EHV were regularly isolated on primary equine embryo kidney cells. Serological testing in ELISA revealed antibodies to both EHV-1 and EHV-4 [29].

Using the EHV type 1 and 4 Discriminating Test (EHV1/EHV4-Ab), blood sera from 30 mares of one of the farms of the Almaty region of Kazakhstan were examined, in which cases of abortions of mares in the last months of pregnancy, as well as cases of birth non-viable foals dying in the first hours of life. The results of the study are presented in table 1.

Table 1 - Differentiation of antibodies to EHV1/EHV4 and EHV4 in equine sera in the ELISA-EHV1/EHV4-Ab test (Svanova Biotech AB, Sweden)

Horse #	EHV1/EHV4	EHV4	Horse #	EHV1/EHV4	EHV4
1	-	+	16	-	+
2	+	+	17	+	+
3	-	+	18	+	+
4	-	+	19	-	+
5	-	+	20	-	+
6	+	+	21	+	+
7	-	+	22	-	+
8	-	+	23	-	+
9	-	+	24	-	+
10	-	+	25	-	+
11	-	+	26	-	+
12	-	+	27	-	+
13	-	+	28	-	+
14	+	+	29	-	+
15	+	+	30	+	+

All horses studied had antibodies to EHV4. 27% of these animals also had antibodies to EHV1. The results obtained indicate the circulation in this population EHV1 and EHV4. The spread of the infection was facilitated by the crowded rearing of animals, the lack of regular vaccination, non-compliance with quarantine measures when newly arriving horses were imported into this farm, as well as when animals were moved within the farm. Based on the results obtained using this ELISA kit, mares with antibodies to EHV1 were separated from the rest of the animals, and from the remaining population of horses with antibodies to EHV4. In these subgroups of horses, the study of the immune background to herpesvirus infections is regularly carried out based on the previous study. This allows, according to the results of ELISA, to separate seronegative animals from seropositive ones, preventing their contact, thereby preventing further circulation of EHV and reducing the number of abortions in this farm.

The Laboratory of Viral Ecology has developed its own PCR kit system for the simultaneous differential diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. When designing primers, a conservative region of the EHV-4 genome, the gB surface membrane gene, was chosen, which has 89.6% identity with the corresponding EHV-1 gene [8]. The alignment of the gB gene with similar sequences from the Genbank was carried out, and conservative regions for primer design were identified. As a result of the sensitivity studies of the PCR kit, it was found that the kit works separately with DNA of the equine rhinopneumonitis virus up to 10^{-5} dilutions (25 picograms), which is comparable to international requirements for PCR sensitivity (Figure 1). This kit allows effective diagnosing of rhinopneumonitis in horses.

Figure 1 - The sensitivity of the PCR kit with diluted DNAs up to 10^{-6} dilution

In 2011, there was an outbreak of equine rhinopneumonitis in Kazakhstan in one of the farms in the south-east of Kazakhstan, where abortions of foals and the birth of non-viable foals that die within the first 12 hours of life were recorded annually. This article in Kazakhstan describes the molecular genetic characteristics of the isolated isolate and provides the structure of its complete genome. In the result of sequencing, obtained reads were de Novo assembled and mapped on the reference EHV-1 genome sequence (Figure 2).

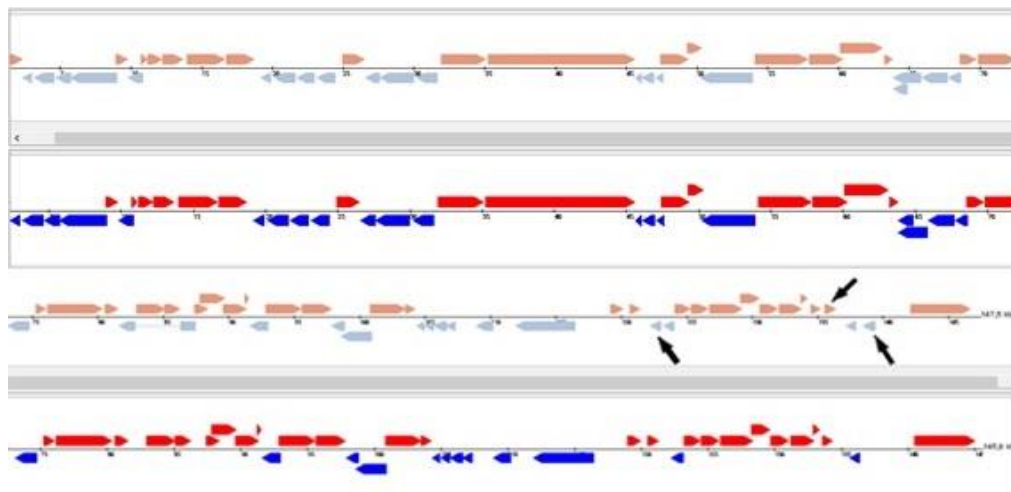


Figure 2 - Scheme of annotation of the genome of the Kazakhstani strain EHV-1

Analysis of the EHV genomes by sequencing showed that in EHV-1 consists of 150,223 base pairs, and in EHV-4 of 145,597 base pairs. In both viruses, they are divided into a long unique region flanked by a short inverted repeat and a short unique region flanked by the main inverted repeat, and consist of 76 open reading frames [30]. In our preliminary study, it was determined that the complete genome of the local EHV strain was more than 145,000 nucleotides and consisted of 74 open reading frames. When the strain was attenuated by multiple passages through cell culture, the virus apparently lost three open reading frames (shown by arrows in Figure 2).

Conclusion

In Kazakhstan, EHV is important viral infection that cause significant damage to horse breeding. The article shows cases of diagnosis, isolation and genetic characterization of local EHV strains.

Serological examination in ELISA revealed antibodies to both EHV-1 and EHV-4 when testing the horse population of the Almaty region. The obtained ELISA results made it possible to separate seronegative animals from seropositive ones, preventing their contact, thereby preventing further circulation of equine herpesviruses and reducing the number of abortions.

The developed PCR kit makes it possible to effectively diagnose rhinopneumonitis in horses in farms of Kazakhstan.

Complete genome sequencing of the local EHV-1 strain will further expand our understanding of the biology of these viruses and open additional opportunities for immunoprophylaxis.

As a rule, a significant number of abortions caused by the virus is associated with a lack of routine diagnostic tests, low vaccination rates, uncontrolled importation of horses, a decrease in resistance to the virus in the winter-spring period, and a long survival of the pathogen in the environment [31].

Funding

The work was carried out within the framework of the BR10764975 Scientific Program "Develop and propose for production methods for diagnosing, preventing diseases, treating

infected animals and decontaminating soil anthrax foci" funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 World Organization of Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 12.8. Infection with Equid Herpesvirus-1 (Equine Rhinopneumonitis). https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_equine_rhinopneumonitis.pdf
- 2 Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D. & Smith K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: Infectious Diseases of Livestock, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa.
- 3 Bryans J.T. & Allen G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. In: Herpesvirus Diseases of Animals, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
- 4 Cullinane, A. A., Rixon, F. J. & Davison, A. J. (1988). Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. Journal of General Virology 69, 1575–1590.
- 5 Telford E.A.R., Watson M.S., McBride K. & Davison A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. Virology, 189, 304–316.
- 6 Davison, A.J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G.S., McGeoch, D.J., Minson, A.C., Pellett, P.E., Roizman, B., Studdert, M.J., Thiry, E., 2009. The order Herpesvirales. Arch. Virol. 154, 171–177.
- 7 Fukushi, H., Tomita, T., Taniguchi, A., Ochia, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T., Hirai, K., 1997. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. Virology 226, 34–44.
- 8 Whitley, R.J., Gnann, J.W., 1993. The epidemiology and clinical manifestation of herpes simplex virus infections. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopaz, C. (Eds.), The Human Herpesviruses. Raven Press, New York, pp. 69–105.
- 9 Smith, D.J., Iqbal, J., Purewal, A., Hamblin, A.S., Edington, N., 1998. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD+5/CD8+ leukocytes indirectly by IL2 or chorionic gonadotrophin. Journal of General Virology 24, 2997–3004.
- 10 Burrows, R., Goodridge, D., Denyer, M.S., 1984. Trials of an inactivated equid herpesvirus-1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus. Veterinary Record 114, 369–374.
- 11 Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., 2002. Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine. Veterinary Microbiology 88, 13–25.
- 12 Heldens, J.G.M., Hannant, D., Cullinane, A.A., Prendergast, M.J., Mumford, J.A., Nelly, M., Kydd, J.H., Weststrate, M.W., Van Den Hoven, R., 2001. Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV-1 and EHV-4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. Vaccine 19, 4307–4317.
- 13 Kaashoek, M., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F.A.M., Quak, J., Gielkens, A.L.J., Van Oirschot, J.T., 1994. A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. Vaccine 12, 439–444.
- 14 Patel, J.R., Fofidi, J., Bateman, H., Williams, J., Didlick, S., Stark, R., 2003b. Equid herpesvirus (EHV-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory diseases following EHV types 1 and 4 challenges. Veterinary Microbiology 92, 1–17.
- 15 Abisheva A, Abishov A, Khairullaeva K, Shynybayev K, Kalissynov B, Maikhin K, Kydyrmanov A, Karamendin K, Valdovska A, Syrym N. 2022. AK-2011 strain for the development of a vaccine against equine rhinopneumonitis. Transbound Emerg Dis. 00:1-10. <https://doi.org/10.1111/tbed.14531>
- 16 Gunn H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. Irish Vet. J., 44, 37–40.
- 17 Schultheiss P.C., Collins J.K. & Carman J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. J. Vet. Diagn. Invest., 5, 12–15.
- 18 Dutta S.K., Talbot N.C. & Myrup A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., 44, 1930–1934.
- 19 Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C.A., Studdert M.J. & Drummer H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. Aust. Vet. J., 79, 563–569.

20 Welch H.M., Bridges C.G., Lyon A.M., Griffiths L. & Edington N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J.Gen. Virol.*, 73, 261–268.

21 Borchers K. & Slater J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, 45, 331–336.

22 Karamendin K.O., Kydyrmanov A.I., Sayatov M.Kh. Development of a PCR for the simultaneous diagnosis of influenza and rhinopneumonitis in horses. *Biotechnology. Theory and Practice*. No. 1, 2013 pp. 20-23

23 Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

24 Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, & Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics* 70:e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

25 Kears M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

26 Kumekbayeva Zh.Zh. Indication, identification of equine herpesviruses, differentiation of EHV1-EHV4 in ELISA test «Svanova Biotech AB». *Proceedings of the 6th REVA Conference «Equine Diseases: Diagnosis, Prophylaxis, Treatment»*, Moscow, Russia, 2005, p.5.

27 Telford E.A.R., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A. & Davison A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, 79, 1197–1203.

28 Castro ER, Arbiza J. Detection and genotyping of equid herpesvirus 1 in Uruguay. *Rev Sci Tech*. 2017 Dec;36(3):799-806. doi: 10.20506/rst.36.3.2715.

MPNТИ: 34.27.19, 34.27.23, 68.35.71, 62.09.37

Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹, Д.Д. БОКЕНОВ¹,
М.Г. САУБЕНОВА¹, А.Б. АЛТЕКЕЙ², А.А. АЙТЖАНОВА¹

¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

² Южно-Казахстанский университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРОМИЦЕТОВ - ЗАСОРИТЕЛЕЙ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ОТХОДОВ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04

Аннотация

Вторичное лигноцеллюлозное сырье является самым крупномасштабным возобновляемым ресурсом на планете. Пожнивные остатки, в частности солома злаковых культур, повсеместно сжигаются, создавая угрозу экологии. Одним из способов использования вторичного лигноцеллюлозного сырья является культивирование высших грибов. Однако энергоемкость термической предобработки субстрата для выращивания грибов ограничивает их производство. В данной работе выделено 23 изолята плесневых грибов, засоряющих пшеничную, ячменную и овсяную солому. Выделено 2 штамма гриба *Trichoderma longibrahmatum*, являющегося патогеном высших целлюлозоразрушающих грибов. Изолировано два штамма *Pleurotus ostreatus* для дальнейшей работы по защите субстрата для культивирования с помощью микроорганизмов антагонистов.

Ключевые слова: возобновляемое лигноцеллюлозное сырье, культивирование съедобных грибов, плесневые грибы, вешенка обыкновенная, триходерма.

Лигноцеллюлозные отходы культивирования различных сельскохозяйственных культур являются самым распространенным возобновляемым целлюлозосодержащим сырьем на планете [1, 2]. Массовое сжигание пожнивных остатков на полях приводит к ухудшению экологической ситуации и потере ценных ресурсов. В мировой практике существуют различные направления использования лигноцеллюлозных отходов сельскохозяйственных культур, включая получение биотоплива [3-6], компостирование [7-9], применение в качестве биоудобрения для стимуляции роста растений и улучшения структуры почвы [10, 11], продукцию ценных соединений [12-14]. Постоянно продолжается поиск новых способов и работа над повышением экономической эффективности использования лигноцеллюлозных отходов для получения продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Одним из путей утилизации целлюлозосодержащих отходов является производство высших целлюлозоразлагающих грибов, отличающееся быстрыми темпами отдачи урожая и большой популярностью продукции [15-18]. Высшие грибы не только являются высокопитательным и деликатесным продуктом питания, но также служат источником биологически активных веществ, используемых в медицине для лечения ряда заболеваний, в первую очередь в качестве противоопухолевых и иммуномодулирующих средств [19-21]. В последние годы доказано влияние грибных полисахаридов и на кишечную микробиоту, продуцирующую короткоцепочечные жирные кислоты [22, 23].

Производство высших грибов осуществляется методом твердофазной ферментации целлюлозосодержащего сырья [24]. Отработанный субстрат, представляющий собой биомассу, обогащенную белками, витаминами, гидролитическими ферментами и другими биологически активными веществами, может быть использован в качестве кормовых добавок [25-27].

Однако производство грибов ограничивает энергоемкость термической подготовки субстрата для их выращивания [28]. При несоблюдении правил асептики происходит бурное развитие конкурирующих микроорганизмов, преимущественно плесневых грибов, накапливающих микотоксины и подавляющих развитие высшего гриба вплоть до полной потери урожая. Поскольку экономические показатели производства высших грибов в значительной степени определяются энергетическими затратами на стерилизацию субстрата, для его биологической защиты могут быть использованы антагонистически активные штаммы микроорганизмов. Использование биопротекции не только уменьшает до минимума риск заражения субстрата конкурентными микроорганизмами, исключая необходимость соблюдения стерильных условий, но и позволяет получить качественную питательную селективную среду для грибов и повысить урожайность гриба [29, 30].

Для подбора антагонистов микромицетов-засорителей субстрата для культивирования гриба вешенка на первом этапе было произведено выделение плесневых грибов.

Объекты и методы исследования

Поскольку солома, преимущественно пшеничная, является основным субстратом, применяемым для культивирования высших грибов, для выделения микромицетов-засорителей использовали главным образом солому: 3 образца пшеничной соломы (2015 и 2020 годов сбора, а также старая солома со следами порчи), ячменную (2020 г.) и овсяную солому (2019 г.). Отобраны также два образца плодовых тел гриба вешенка обыкновенная и мицелий целлюлозоразрушающих грибов (2 образца) из полуразрушенной древесины.

Мицелий вешенки получали на сусло-агаре (Wort agar, TM Media, India). Плесневые грибы выделяли на среде Чапека (г/л): сахароза 30,0; NaNO_3 2,0; KH_2PO_4 1,0; MgSO_4 0,5; KCl 0,5; агар-агар 20,0; вода водопроводная. Стерилизация при 1 атм. (121 °C) – 20 мин.

Для изоляции грибов образцы соломы и части плодовых тел вешенки раскладывали на поверхности агаризованной среды в чашках Петри. Поверхность плодовых тел вешенки предварительно обрабатывали этиловым спиртом, стерильно разрезали и использовали внутренние части гриба для посева. Грибы культивировали при 28–30 °C до 7 суток. Затем грибы рассевали для получения чистых культур. Выделенные культуры хранили на скошенном агаре в холодильнике при 5 °C.

Видовую принадлежность грибов вешенка и триходерма определяли секвенированием ITS (Internal transcribed spacer) региона по методу Сенгера.

Для построения филогенетического дерева проводили сравнение ITS региона исследуемого образца с последовательностями референтных штаммов, размещенных в Международной базе данных Blast Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Построение дерева производили в программе Mega 11, последовательности выравнивали по ClustalW.

Результаты и обсуждение

При помещении различных образцов соломы на поверхность питательной среды было выявлено значительное разнообразие плесневых грибов. Для выделения были отобраны микромицеты четко различающейся морфологии с каждого исходного субстрата. Грибы были пересеяны неоднократно до получения чистой культуры. В целом, из образцов соломы выделено 23 изолята плесневых грибов: 14 - из пшеничной соломы, 5 - из ячменной и 4 - из овсяной (таблица 1, рисунок 1).

Особенности морфологии выделенных изолятов при росте на среде Чапека представлены в таблице 1. Наиболее частыми изолятами с различных образцов пшеничной соломы были микромицеты родов *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium*. Ранее было показано, что грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* являются основными засорителями различных растительных субстратов [31]. Присутствие плесневых грибов рода *Fusarium* по-видимому

Таблица 1 - Мицелиальные грибы с поверхности соломы – потенциальные засорители производства высших грибов

Источник выделения	Номер изолята	Субстратный мицелий	Воздушный мицелий	Продукция пигмента в среду	Примечание
1	2	3	4	5	6
Пшеничная солома 1 (урожай 2020 г)	Пш 1-1	Белый	Черный	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Aspergillus niger</i>
	Пш 1-2	Белый	Синевато-зеленый	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Penicillium</i> sp.
	Пш 1-3	Серовато-белый	Желтовато-белый	Еле заметный серовато-желтоватый	Предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Пш 1-4	Темно-бурый	Бурый	Отсутствует	-
	Пш 1-5	Темно-бурый или серый	Серо-бежевый равномерный с зеленовато-серыми хохлами	Черный	-
	Пш 1-6	Сероватый или темнее	Сероватый	Буровато-коричневый	Колонии мелкие, 5-7 мм диаметром, иногда с серыми или буроватыми кольцами и конденсатом.
Пшеничная солома 2 (порченная)	Пш 2-1	Сероватый, вид снизу буроватый	Зеленовато-серый	Бледно-бурый	-
	Пш 2-2	Белый	Серо-зеленый	Очень слабый желтоватый	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Penicillium</i> sp.
	Пш 2-3	Кремовато-серовато-белый	Кремовато-серовато-белый	Отсутствует	Мицелий равномерный невысокий
	Пш 2-4	Серо-бурый, снизу бурый	Буровато-серый	Слабый серовато-бурый	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
Пшеничная солома 3 (урожай 2015 г.)	Пш 3-1	Белый	Черный	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>A. niger</i>
	Пш 3-2	Белый	Белый с темно-серыми конидиями	Отсутствует	Мицелий высокий, равномерный, предположительно <i>Mucor</i> sp.
	Пш 3-3	Белый	Серо-зеленый	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Penicillium</i> sp.
	Пш 3-4	Бежегато-белый	Бежегато-белый	Очень слабый желтоватый	Мицелий невысокий, равномерный
Ячменная солома	Яч-1	Белый, местами с розоватым оттенком	Белый	Слабый коричневатого-желтый	Воздушный мицелий равномерный, предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Яч-2	Белый	Серовато-бурый	Отсутствует	По морфологии роста и плодоношения соответствует <i>Aspergillus</i> sp.
	Яч-3	Черно-бурый	Серый	Отсутствует	-
	Яч-4	Молочно-белый	Белый	Очень слабый желтый	Воздушный мицелий равномерный, предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Яч-5	Черновато-оливковый	Серый с желтовато-зеленоватыми хохлами	Бурый	-
Овсяная солома	Ов-1	Белый	Белый	Отсутствует	Воздушный мицелий высокий, плотный, похож на комки ваты, предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Ов-2	Белый	Розовато-бежеватый	Отсутствует	Предположительно <i>Fusarium</i> sp.
	Ов-3	Сероватый	Сероватый	Светло-бурый	Мицелий не высокий
	Ов-4	Черноватый	Серый	Розовато-бурый	-

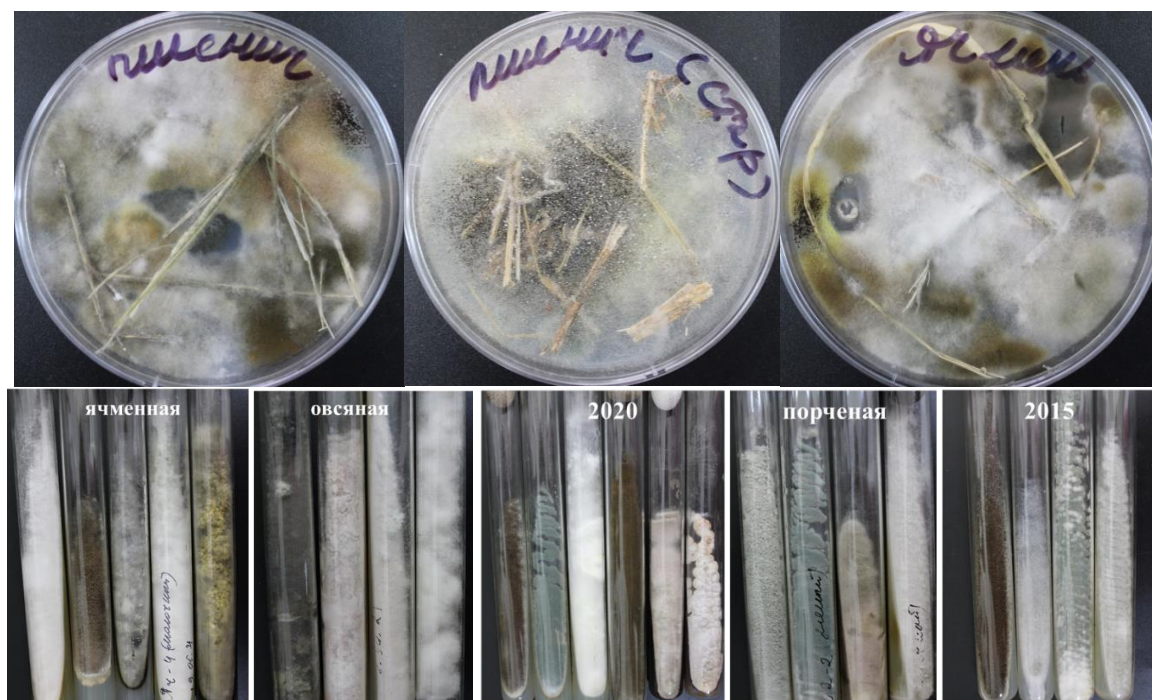
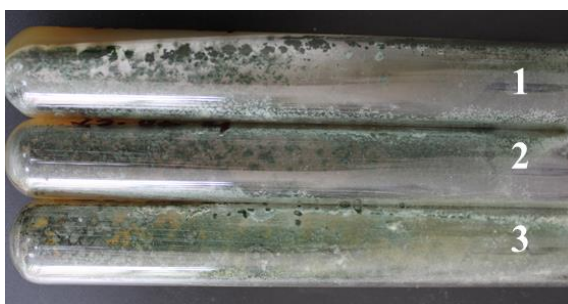


Рисунок 1 – Микромицеты-засорители различных образцов пшеничной, ячменной и овсяной соломы

объясняется их широким распространением в качестве фитопатогенов зерновых культур [32, 33]. Свежая солома характеризовалась более широким набором мицелиальных грибов различной родовой принадлежности. В ней встречались также грибы с серой, бурой и оливковой окраской мицелия. Однако при хранении количество плесневых грибов с такой пигментацией мицелия на поверхности соломы сокращалось, начинали доминировать роды *Penicillium*, *Aspergillus* и *Mucor*. Интересно, что грибы рода *Penicillium* не были выделены из ячменной и овсяной соломы, а *Fusarium* был представлен практически во всех образцах.

Из плодовых тел гриба вешенка и целлюлозоразрушающего гриба, изолированного из полуразрушенного пня, выделены изоляты мицелиальных грибов зеленой окраски, предположительно относящиеся к роду *Trichoderma*. Известно, что плесневые грибы рода *Trichoderma* вызывают потери урожая высших базидиальных грибов, в частности вешенки, во всем мире на протяжении последних 25 лет [34-37]. В нашем исследовании виды рода *Trichoderma* не были выявлены на поверхности пшеничной, ячменной или овсяной соломы, однако были выделены из плодовых тел и мицелия целлюлозоразрушающих грибов, в том числе из коммерчески доступных образцов вешенки обыкновенной.

На рисунке 2 показан рост изолятов *Trichoderma* из плодовых тел вешенки и мицелия целлюлозоразрушающего гриба.



Примечание – 1, 2 изоляты из плодового тела вешенки обыкновенной; 3 из мицелия целлюлозоразрушающего гриба.

Рисунок 2 – Изоляты гриба *Trichoderma* из целлюлозоразрушающих грибов

Проведен молекулярно-генетический анализ двух вариантов гриба вешенка обыкновенная (V1 и V2) и полученных из них изолятов *Trichoderma* sp. V и *Trichoderma* sp. VG.

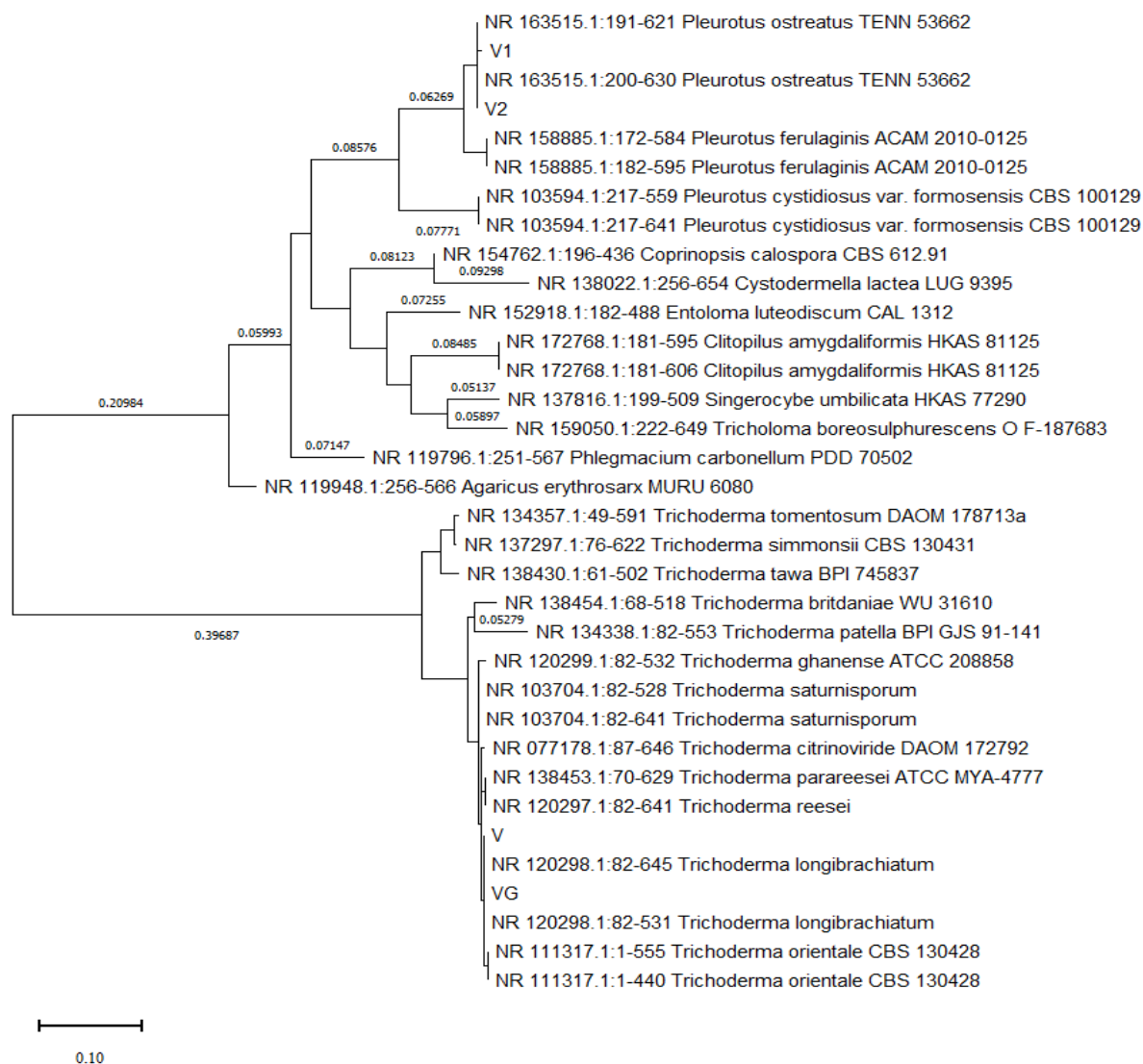


Рисунок 3 – Филогенетическое древо изолятов гриба вешенка обыкновенная (V1 и V2) и грибов рода триходерма (V и VG) из плодовых тел вешенки

Грибы рода *Trichoderma* отнесены к виду *Trichoderma longibrachiatum*. Из литературных данных известно, что *T. longibrachiatum* наряду с видом *Trichoderma harzianum* является причиной зеленой плесени при производстве различных высших грибов [35, 38].

Закключение

Таким образом, в целом было выделено 23 изолята плесневых грибов с поверхности различных образцов соломы: 14 изолятов - из пшеничной соломы, 5 - с ячменной, 4 - с овсяной соломы. Получено 2 штамма гриба *P. ostreatus* (вешенка обыкновенная) и 2 штамма гриба *T. longibrachiatum*, являющегося патогеном *P. ostreatus*.

Отобранные культуры микромицетов-засорителей и штаммы *T. longibrachiatum* будут использованы для выделения бактерий антагонистов при разработке комплексного метода утилизации соломы с применением высшего гриба *P. ostreatus*.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке КН МНВО РК (грант № AP09258654).

Литература:

- 1 Adhikari S., Nam H., Chakraborty J. P. Conversion of solid wastes to fuels and chemicals through pyrolysis // Waste Biorefinery. Eds: Bhaskar T., Pandey A., Mohan S.V., Lee D.J., Khanal S.K. - Amsterdam, Oxford, Cambridge: Elsevier, 2018. – P. 239-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00008-2>
- 2 Ali N., Zhang Q., Liu Z., Li F., Lu M., Fang X. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products // Appl Microbiol Biotechnol. – 2020. – Vol. 104(2). – P. 455-473. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10158-w>
- 3 Zhang J., Rentizelas A., Zhang X., Li J. Sustainable production of lignocellulosic bioethanol towards zero waste biorefinery // Sustainable Energy Technologies and Assessments. – 2022. – Vol. 53, Part C. – Art. ID 102627. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102627>
- 4 Bhujbal S.K., Ghosh P., Vijay V.K., Rathour R., Kumar M., Singh L., Kapley A. Biotechnological potential of rumen microbiota for sustainable bioconversion of lignocellulosic waste to biofuels and value-added products // Science of the Total Environment. – 2022. – Vol. 814. – Art. ID 152773. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152773>
- 5 Naik G.P., Poonia A.K., Chaudhari P.K. Pretreatment of lignocellulosic agricultural waste for delignification, rapid hydrolysis, and enhanced biogas production: A review // Journal of the Indian Chemical Society. – 2021. – Vol. 98, Issue 10. – Art. ID 100147. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100147>
- 6 Nahak B.K., Preetam S., Sharma D., Shukla S.K., Syväjärvi M., Toncu D.C., Tiwari A. Advancements in net-zero pertinency of lignocellulosic biomass for climate neutral energy production // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – Vol. 161. – Art. ID 112393. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112393>
- 7 Greff B., Szigeti J., Nagy Á., Lakatos E., Varga L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review // Journal of Environmental Management. – 2022. – Vol. 302, Part B. – Art. ID 114088. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114088>
- 8 Harindintwali J.D., Zhou J., Yu X. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 715. – Art. ID 136912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136912>
- 9 Jin X., Ai W., Zhang Y., Dong W. Application of functional microbial agent in aerobic composting of wheat straw for waste recycling // Life Sciences in Space Research. – 2022. – Vol. 33. – P. 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2022.02.002>
- 10 Shinde R., Shahi D.K., Mahapatra P., Naik S.K., Thombare N., Singh A.K. Potential of lignocellulose degrading microorganisms for agricultural residue decomposition in soil: A review // Journal of Environmental Management. – 2022. – Vol. 320. – Art. ID 115843. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115843>
- 11 Lin L., Zheng Z., Hua T., Ashraf U., Hamoud Y.A., Alaa Al Aasmi, Xiangru T., Meiyang D., Wang Zaiman, Shenggang P. Nitrogen deep placement combined with straw mulch cultivation enhances physiological traits, grain yield and nitrogen use efficiency in mechanical pot-seedling transplanting rice // Rice Science. – 2022. – Vol. 29, Issue 1. – P. 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2021.12.008>
- 12 Wang J., Liu S., Huang J., Qu Z. A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste Biomass: Development, Advances, circular Approach, and challenges // Bioresource Technology. – 2021. – Vol. 342. – Art. ID 126008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>
- 13 Son J., Joo J.C., Baritugo K.A., Jeong S., Lee J.Y., Lim H.J., Lim S.H., Yoo J.I., Park S.J. Consolidated microbial production of four-, five-, and six-carbon organic acids from crop residues: Current status and perspectives // Bioresour Technol. – 2022. – Vol. 351. – Art. ID 127001. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127001>
- 14 Safian M.T., Sekeri S.H., Yaqoob A.A., Serrà A., Jamudin M.D., Mohamad Ibrahim M.N. Utilization of lignocellulosic biomass: A practical journey towards the development of emulsifying agent // Talanta. – 2022. – Vol. 239. – Art. ID 123109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123109>
- 15 Zhang H.L., Wei J.K., Wang Q.H., Yang R., Gao X.J., Sang Y.X., Cai P.P., Zhang G.Q., Chen Q.J. Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9. – P. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37681-6>

16 Melanouri E.M., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase // Carbon Resour Convers. – 2022. – Vol. 5, Issue 1. – P. 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>

17 Raman J., Jang K., Oh Y., Oh M., Im J., Lakshmanan H., Sabaratnam V. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview // Mycobiology. – 2021. – Vol. 49, Issue 1. – P. 1-14. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1835142>

18 Ritota M., Manzi P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application // Sustainability. – 2019. – Vol. 11, Issue 18. – Art. ID 5049. <https://doi.org/10.3390/su11185049>

19 Yadav D., Negi P.S. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits // Food Research International. – 2021. – Vol. 148. – Art. ID 110599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>

20 Motta F., Gershwil M.E., Selmi C. Mushrooms and immunity // Journal of Autoimmunity. – 2021. – Vol. 117. – Art. ID 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>

21 Rizzo G., Goggi S., Giampieri F., Baroni L. A review of mushrooms in human nutrition and health // Trends in Food Science and Technology. – 2021. – Vol. 117. – P. 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.025>

22 Li M., Yu L., Zhao J., Zhang H., Chen W., Zhai Q., Tian F. Role of dietary edible mushrooms in the modulation of gut microbiota // J Funct Foods. – 2021. – Vol. 83. – Art. ID 104538. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104538>

23 Yin C., Noratto G.D., Fan X., Chen Z., Yao F., Shi D., Gao H. The impact of mushroom polysaccharides on gut microbiota and its beneficial Effects to Host: A Review // Carbohydrate Polymers. – 2020. – Vol. 250. – Art. ID 116942. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116942>

24 Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis // Heliyon. – 2022. – Vol. 8(3). – Art. ID e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

25 van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review // Biotechnol Adv. – 2015. – 33(1). – P. 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>

26 Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production // J Clean Prod. – 2021. – Vol. 313. – Art. ID 127969. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127969>

27 Leong Y.K., Ma T.W., Chang J.S., Yang F.C. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review // Biores Technol. – 2022. – Vol. 344(A). – Art. ID 126157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126157>

28 Hernández D., Sánchez J.E., Yamasaki K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation // Bioresource Technology. – 2003. – Vol. 90(2). – P. 145-150. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00118-4)

29 Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Oleinikova Y.A. The use of bacteria-producers of cellulose and organic acids for stimulation of growth of the mycelium of the oyster mushroom // Int J Appl Fundam Res. – 2017. – Vol. 10, Part 1. – P. 102-105. <https://applied-research.ru/en/article/view?id=11870>

30 Пат. 030400 ЕАПО, А01G 1/04 (2006.01). Способ подготовки субстрата для выращивания мицелия гриба вешенка / Саданов А.К., Саубенова М.Г., Кузнецова Т.В., Сулейменова Ж.Б.; заявитель и патентообладатель РГП на ПХВ "Институт микробиологии и вирусологии" КН МОН РК (KZ). – № 201500005; заявл. 2014.09.25; опубл. 2018.07.31, Бюл. №07. – 5 с.

31 Kosel J., Ropret P. Overview of fungal isolates on heritage collections of photographic materials and their biological potency // Journal of Cultural Heritage. – 2021. – Vol. 48. – P. 277-291. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.01.004>

32 Patel R., Mehta K., Prajapati J., Shukla A., Parmar P., Goswami D., Saraf M. An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes // Biological Control. – 2022. – Vol. 174. – Art. ID 105012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105012>

33 Martínez M., Biganzoli F., Arata A., Dinolfo M.I., Rojas D., Cristos D., Stenglein S. Warm nights increase *Fusarium* Head Blight negative impact on barley and wheat grains // Agricultural and Forest Meteorology. – 2022. – Vol. 318. – Art. ID 108909. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.108909>

34 Jayalal R.G.U., Adikaram N.K.B. Influence of *Trichoderma harzianum* metabolites on the development of green mould disease in the oyster mushroom // Cey. J. Sci. (Bio. Sci.). - 2007. – Vol. 36. – P. 53–60.

35 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvölgyi C., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom // FEMS Microbiol. Lett. - 2009. – Vol. 300. – P. 58-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x>.

36 Błaszczuk L., Siwulski M., Sobieralski K., Frużyńska-Jóźwiak D. Diversity of *Trichoderma* spp. causing *Pleurotus* green mould diseases in Central Europe // Folia Microbiol. (Praha). - 2013. – Vol. 58. – P. 325–333. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0214-6>

37 Innocenti G., Montanari M., Righini H., Roberti R. *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz // Plant Pathology. – 2019. - Vol. 68, Issue2. – P. 392-398.

38 Al-Ani B.M., Owaid M.N., Al-Saeedi S.S.S. Fungal interaction between *Trichoderma* spp. and *Pleurotus ostreatus* on the enriched solid media with licorice *Glycyrrhiza glabra* root extract // Acta Ecologica Sinica. – 2018. – Vol. 38, Issue 3. – P. 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001>

Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹, Д.Д. БОКЕНОВ¹,
М.Г. САУБЕНОВА¹, А.Б. АЛТЕКЕЙ², А.А. АЙТЖАНОВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы,
Алматы, Қазақстан

² М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан
*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ДӘНДІ ДАҚЫЛДАРДЫҢ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗА ҚАЛДЫҚТАРЫНАН ЛАСТУШЫ-МИКРОМИЦЕТТЕРІН БӨЛІП АЛУ

Түйін

Екіншілік лигноцеллюлоза шикізаты планетадағы ең ауқымды жаңартылатын ресурс болып табылады. Өсімдік қалдықтары, атап айтқанда дәнді дақылдардың сабаны әрдайым жағылып отыратындықтан экологияға қауіп төндіреді. Екіншілік лигноцеллюлоза шикізатын пайдаланудың бір жолы-жоғарғы сатыдағы саңырауқұлақтарды өсіру. Дегенмен, саңырауқұлақтарды өсіру үшін қолданылатын субстраттың термиялық өңдеудегі энергия сыйымдылығы олардың өндірісін шектейді. Бұл жұмыста бидай, арпа және сұлы сабанын ластайтын 23 зең саңырауқұлақтарының изоляты оқшауланған. Целлюлозаны бұзатын жоғарғы сатыдағы саңырауқұлақтардың патогені болып табылатын *Trichoderma longibrachiatum* саңырауқұлақтарының 2 штаммы оқшауланған. Антагонистік микроорганизмдердің көмегімен өсірілетін субстратты қорғау үшін *Pleurotus ostreatus* екі штаммы оқшауланған..

Кілтті сөздер: жаңартылатын лигноцеллюлоза шикізаты, жеуге жарамды саңырауқұлақтарды өсіру, зең саңырауқұлақтары, кәдімгі устрица саңырауқұлағы, триходерма.

IRSTI: 34.27.19, 34.27.23, 68.35.71, 62.09.37

Zh.N. YERMEKBAY¹, Ye.A. OLENIKOVA^{1*}, S.T. DAUGALIYEVA¹, D.D. BOKENOV¹,
M.G. SAUBENOVA¹, A.B. ALTEKEY², A.A. AITZHANOVA¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²M. Auezov South Kazakhstan University, Shymkent, Kazakhstan

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ISOLATION OF SPOILING MICROMYCETES IN LIGNOCELLULOSIC RESIDUES OF CEREAL CROPS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.04

Abstract

Lignocellulosic secondary raw materials are the largest renewable resource on the planet. Crop residues, in particular cereals straws, are burned everywhere, creating a threat to the environment. One of the ways to use secondary lignocellulosic crop waste is the cultivation of higher fungi. However, the energy intensity of the thermal pretreatment of the substrate for growing mushrooms limits their production. This work identified 23 isolates of mold fungi that spoil wheat, barley, and oat straws. Two strains of the fungus *Trichoderma longibrahmatum*, a cellulose-destroying edible mushroom pathogen, have been isolated. Two strains of *Pleurotus ostreatus* were selected for further work on protecting the substrate for cultivation with antagonistic microorganisms.

Key words: renewable lignocellulosic raw materials, cultivation of edible mushrooms, molds, oyster mushroom, *Trichoderma*.

Lignocellulosic waste from the cultivation of various crops is the most common renewable cellulose-containing raw material on the planet [1, 2]. Mass burning of crop residues in the fields leads to environmental degradation and the loss of valuable resources. In world practice, there are various directions for the use of lignocellulosic agricultural wastes, including biofuel production [3-6], composting [7-9], use as a biofertilizer for promoting plant growth, and improving soil structure [10, 11], and the production of valuable compounds [12-14]. The search for new ways and work to improve the economic efficiency of using lignocellulosic waste to produce high-value-added products is constantly ongoing.

One of the ways to utilize cellulose-containing waste is the production of cellulose-decomposing higher fungi, which is characterized by a fast yield rate and high popularity of products [15-18]. Mushrooms are not only a highly nutritious and delicacy food product but also serve as a source of biologically active substances used in medicine for the treatment of several diseases, primarily as antitumor and immunomodulatory agents [19–21]. In recent years, the effect of fungal polysaccharides on the intestinal microbiota, which produces short-chain fatty acids, has also been proven [22, 23].

The production of mushrooms is carried out by the method of solid-phase fermentation of cellulose-containing raw materials [24]. The spent mushroom substrate, which is biomass enriched with proteins, vitamins, hydrolytic enzymes, and other biologically active substances, can be used as feed additives [25–27].

However, the energy intensity of the thermal preparation of the substrate for mushroom cultivation limits their production [28]. If the rules of asepsis are not observed, there is a rapid development of competing microorganisms, mainly mold fungi, accumulating mycotoxins and suppressing the development of a higher fungus, up to a complete loss of the crop. Since the economic indicators of the production of mushrooms are largely determined by the energy costs for the sterilization of the substrate, antagonistically active strains of microorganisms can be used for biological protection. The use of bioprotection not only minimizes the risk of substrate contamination with competitive microorganisms eliminating the need to comply with sterile

conditions but also makes it possible to obtain a high-quality selective medium and increase the yield of the mushroom [29, 30].

For the selection of antagonists of substrate spoiling micromycetes during cultivation of the oyster mushroom, mold fungi were isolated at the first stage.

Materials and methods

Since straw, mainly from wheat, is the main substrate used for the cultivation of mushrooms, it was mainly used to isolate spoiling micromycetes: three samples of wheat straw (collected in 2015 and 2020, as well as old straw with traces of spoilage), barley (2020) and oat straw (2019). Two samples of fruiting bodies of oyster mushrooms and mycelium of cellulose-destroying fungi (2 samples) from semi-decomposed wood were also selected.

Oyster mushroom mycelium was obtained on Wort agar (TM Media, India). Molds were isolated on Czapek's medium (g/l): sucrose 30.0; NaNO_3 2.0; KH_2PO_4 1.0; MgSO_4 0.5; KCl 0.5; agar-agar 20.0; tap water, sterilization at 1 atm. (121 °C) for 20 min.

To isolate fungi, samples of straw and parts of oyster mushroom fruiting bodies were laid out on the surface of an agar medium in Petri dishes. The surface of oyster mushroom fruit bodies was preliminarily treated with ethyl alcohol, and sterilely cut, and then the internal parts of the fungus were used for seeding. The cups were cultivated at 28-30 °C for up to 7 days. The fungi were then plated until pure cultures were obtained. The isolated cultures were stored on agar slants in a refrigerator at 5°C.

The species affiliation of oyster mushrooms and *Trichoderma* was determined by sequencing the ITS (Internal transcribed spacer) region according to the Sanger method.

To build a phylogenetic tree, the ITS of the region of the studied sample was compared with the sequences of reference strains located in the International Blast Database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The tree was built using the Mega 11 program; the sequences were aligned according to ClustalW.

Results and discussion

When straw samples were placed on the surface of the nutrient medium, a significant variety of mold fungi was revealed. For isolation, micromycetes of clearly different morphology were selected from each initial substrate. Mushrooms were reseeded several times until a pure culture was obtained. In total, 23 mold isolates were selected from various straw samples: 14 from wheat straw, 5 from barley straw, and 4 from oat straw (table 1, figure 1).

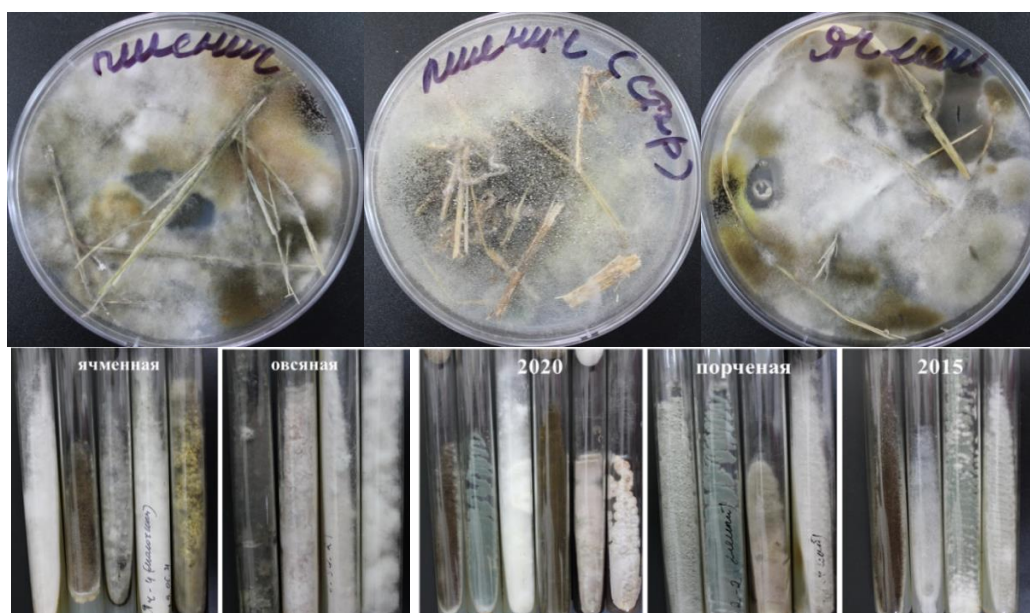


Figure 1 – Spoiling micromycetes of various samples of wheat, barley, and oat straw

Features of the morphology of selected isolates during growth on Czapek's medium are presented in Table 1. The most common isolates from various samples of wheat straw were micromycetes of the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium*. It was previously shown that fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* are the main spoilers of various plant substrates [31]. The presence of mold fungi of the genus *Fusarium* is apparently due to their wide distribution as phytopathogens of grain crops [32, 33]. Fresh straw was characterized by a wider range of filamentous fungi of various genera. It also contained fungi with gray, brown, and olive colors of mycelium. However, during storage, the number of mold fungi with such pigmentation of the mycelium on the straw surface decreased, and the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Mucor* began to dominate. Interestingly, molds of the genus *Penicillium* were not isolated from barley and oat straw, while *Fusarium* was present in almost all samples.

Isolates of green mold presumably belonging to the genus *Trichoderma*, were selected from the fruiting bodies of the oyster mushroom and the cellulose-destroying fungus from a dilapidated stump. Molds of the genus *Trichoderma* have been known to cause crop losses of basidiomycetes, in particular oyster mushrooms, over the past 25 years throughout the world [34-37]. In our study, species of the genus *Trichoderma* were not found on the surface of wheat, barley, or oat straw but were isolated from the fruit bodies and mycelium of cellulose-decomposing fungi, including from commercially available samples of oyster mushrooms.

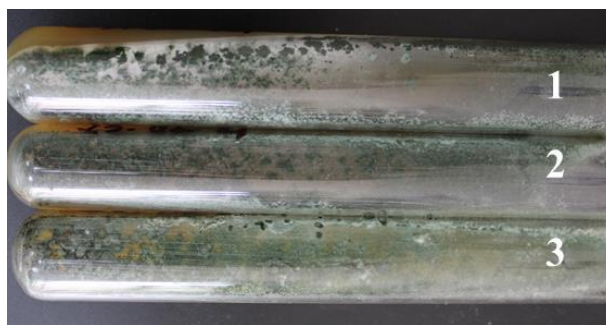
Figure 2 shows the growth of *Trichoderma* isolates from oyster mushroom fruiting bodies and mycelium of a cellulose-decomposing fungus.

Table 1 - Straw filamentous fungi - potential spoilers in the production of higher fungi

Selection source	Isolate number	Substrate mycelium	Aerial mycelium	Pigment production into a medium	Note
1	2	3	4	5	6
Wheat straw 1 (harvest 2020)	Wh 1-1	White	Black	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Aspergillus niger</i>
	Wh 1-2	White	Bluish green	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Penicillium</i> sp.
	Wh 1-3	Grayish white	Yellowish white	Barely noticeable grayish yellowish	Presumably <i>Fusarium</i> sp.
	Wh 1-4	Dark brown	Brown	No	-
	Wh 1-5	Dark brown or gray	Even gray-beige with greenish-gray fluffy parts	Black	-
	Wh 1-6	Grayish or darker	Grayish	Brown	Small colonies, 5-7 mm in diameter, sometimes with gray or brownish rings and condensate.
Wheat straw 2 (spoiled)	Wh 2-1	Greyish, brownish ventral view	Greenish gray	Pale brown	-
	Wh 2-2	White	Grey-green	Very faint yellowish	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Penicillium</i> sp.
	Wh 2-3	Creamy grayish white	Creamy grayish white	No	Mycelium uniform and low
	Wh 2-4	Grey-brown, brown on the underside	Brownish gray	Weak grayish brown	-

Table 1 continued

1	2	3	4	5	6
Wheat straw 3 (harvest 2015)	Wh 3-1	White	Black	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>A. niger</i>
	Wh 3-2	White	White with dark gray conidia	No	Mycelium is high, uniform, presumably <i>Mucor</i> sp.
	Wh 3-3	White	Grey-green	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Penicillium</i> sp.
	Wh 3-4	Beige white	Beige white	Very faint yellowish	Mycelium is low and uniform
Barley straw	Bl-1	White, sometimes with a pinkish tint	White	Weak brownish yellow	Aerial mycelium is uniform, presumably <i>Fusarium</i> sp.
	Bl-2	White	Grayish brown	No	According to the morphology of growth and fruiting corresponds to <i>Aspergillus</i> sp.
	Bl-3	Black brown	Gray	No	-
	Bl-4	Milky white	White	Very weak yellow	Aerial mycelium uniform, presumably <i>Fusarium</i> sp.
	Bl-5	Blackish olive	Gray with yellowish-greenish tufts	Brown	-
Oat straw	O-1	White	White	No	The aerial mycelium is high, dense, similar to cotton balls, presumably <i>Fusarium</i> sp.
	O-2	White	Pinkish beige	No	Presumably <i>Fusarium</i> sp
	O-3	Grayish	Grayish	Light brown	Mycelium is not tall
	O-4	Blackish	Gray	Pinkish brown	-



Note - 1, 2 isolates from the fruiting body of oyster mushroom; 3 from the mycelium of a cellulose-decomposing fungus.

Figure 2 - *Trichoderma* fungus isolates from cellulose-decomposing fungi

Molecular genetic analysis of two variants of the oyster mushroom (V1 and V2) and isolates of *Trichoderma* sp. V and *Trichoderma* sp. VG.

The oyster mushroom has been confirmed to belong to *Pleurotus ostreatus* (figure 3).

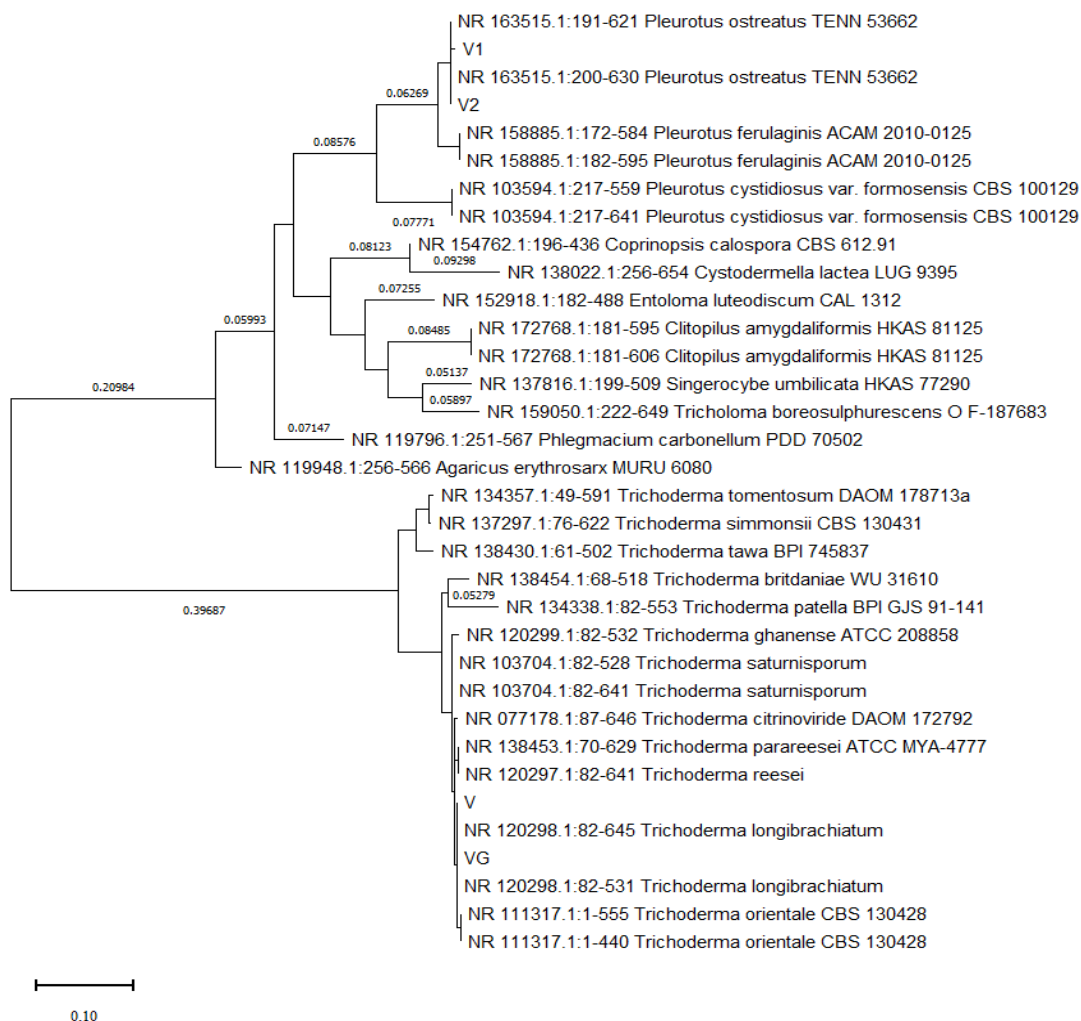


Figure 3 - Phylogenetic tree of oyster mushroom isolates (V1 and V2) and fungi of the genus *Trichoderma* (V and VG) from oyster mushroom fruiting bodies

Fungi of the genus *Trichoderma* were assigned to the species *Trichoderma longibrahiatum*. From the literature data, it is known that *T. longibrahiatum*, along with the species *Trichoderma harzianum*, is the cause of green mold disease in the production of various mushrooms [35, 38].

Conclusion

Thus, in total, 23 mold isolates were isolated from the surface of various straw samples: 14 isolates from wheat straw, 5 from barley straw, and 4 from oat straw. Two strains of *P. ostreatus* fungus (oyster mushroom) and two strains of *T. longibrahiatum* fungus, which is a pathogen of *P. ostreatus*, were obtained.

Selected cultures of spoiling micromycetes and strains of *T. longibrahiatum* will be used to isolate antagonistic bacteria for the development of an integrated method for straw utilization using the *P. ostreatus* mushroom.

Funding

This research is funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP092586540).

References:

- 1 Adhikari S., Nam H., Chakraborty J. P. Conversion of solid wastes to fuels and chemicals through pyrolysis. Waste Biorefinery. Eds: Bhaskar T., Pandey A., Mohan S.V., Lee D.J., Khanal S.K. - Amsterdam, Oxford, Cambridge: Elsevier, 2018. P. 239-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63992-9.00008-2>
- 2 Ali N., Zhang Q., Liu Z., Li F., Lu M., Fang X. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. Appl Microbiol Biotechnol. 2020. Vol. 104(2). P. 455-473. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10158-w>
- 3 Zhang J., Rentizelas A., Zhang X., Li J. Sustainable production of lignocellulosic bioethanol towards zero waste biorefinery. Sustainable Energy Technologies and Assessments. 2022. Vol. 53, Part C. Art. ID 102627. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102627>
- 4 Bhujbal S.K., Ghosh P., Vijay V.K., Rathour R., Kumar M., Singh L., Kapley A. Biotechnological potential of rumen microbiota for sustainable bioconversion of lignocellulosic waste to biofuels and value-added products. Science of the Total Environment. 2022. Vol. 814. Art. ID 152773. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152773>
- 5 Naik G.P., Poonia A.K., Chaudhari P.K. Pretreatment of lignocellulosic agricultural waste for delignification, rapid hydrolysis, and enhanced biogas production: A review. Journal of the Indian Chemical Society. 2021. Vol. 98, Issue 10. Art. ID 100147. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100147>
- 6 Nahak B.K., Preetam S., Sharma D., Shukla S.K., Syväjärvi M., Toncu D.C., Tiwari A. Advancements in net-zero pertinency of lignocellulosic biomass for climate neutral energy production. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2022. Vol. 161. Art. ID 112393. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112393>
- 7 Greff B., Szigeti J., Nagy Á., Lakatos E., Varga L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review. Journal of Environmental Management. 2022. Vol. 302, Part B. Art. ID 114088. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114088>
- 8 Harindintwali J.D., Zhou J., Yu X. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: A novel tool for environmental sustainability. Science of the Total Environment. 2020. Vol. 715. Art. ID 136912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136912>
- 9 Jin X., Ai W., Zhang Y., Dong W. Application of functional microbial agent in aerobic composting of wheat straw for waste recycling. Life Sciences in Space Research. 2022. Vol. 33. P. 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2022.02.002>
- 10 Shinde R., Shahi D.K., Mahapatra P., Naik S.K., Thombare N., Singh A.K. Potential of lignocellulose degrading microorganisms for agricultural residue decomposition in soil: A review. Journal of Environmental Management. 2022. Vol. 320. Art. ID 115843. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115843>
- 11 Lin L., Zheng Z., Hua T., Ashraf U., Hamoud Y.A., Alaa Al Aasmi, Xiangru T., Meiyang D., Wang Zaiman, Shenggang P. Nitrogen deep placement combined with straw mulch cultivation enhances

physiological traits, grain yield and nitrogen use efficiency in mechanical pot-seedling transplanting rice. *Rice Science*. 2022. Vol. 29, Issue 1. P. 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2021.12.008>

12 Wang J., Liu S., Huang J., Qu Z. A review on polyhydroxyalkanoate production from agricultural waste Biomass: Development, Advances, circular Approach, and challenges. *Bioresource Technology*. 2021. Vol. 342. Art. ID 126008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126008>

13 Son J., Joo J.C., Baritugo K.A., Jeong S., Lee J.Y., Lim H.J., Lim S.H., Yoo J.I., Park S.J. Consolidated microbial production of four-, five-, and six-carbon organic acids from crop residues: Current status and perspectives. *Bioresour Technol*. 2022. Vol. 351. Art. ID 127001. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127001>

14 Safian M.T., Sekeri S.H., Yaqoob A.A., Serrà A., Jamudin M.D., Mohamad Ibrahim M.N. Utilization of lignocellulosic biomass: A practical journey towards the development of emulsifying agent. *Talanta*. 2022. Vol. 239. Art. ID 123109. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123109>

15 Zhang H.L., Wei J.K., Wang Q.H., Yang R., Gao X.J., Sang Y.X., Cai P.P., Zhang G.Q., Chen Q.J. Lignocellulose utilization and bacterial communities of millet straw based mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Sci Rep*. 2019. Vol. 9. P. 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37681-6>

16 Melanouri E.M., Dedousi M., Diamantopoulou P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resour Convers*. 2022. Vol. 5, Issue 1. P. 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>

17 Raman J., Jang K., Oh Y., Oh M., Im J., Lakshmanan H., Sabaratnam V. Cultivation and nutritional value of prominent *Pleurotus* spp.: An overview. *Mycobiology*. 2021. Vol. 49, Issue 1. P. 1-14. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1835142>

18 Ritota M., Manzi P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application. *Sustain*. 2019. Vol. 11, Issue 18. Art ID 5049. <https://doi.org/10.3390/su11185049>

19 Yadav D., Negi P.S. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International*. 2021. Vol. 148. Art. ID 110599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>

20 Motta F., Gershwin M.E., Selmi C. Mushrooms and immunity. *Journal of Autoimmunity*. 2021. Vol. 117. Art. ID 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>

21 Rizzo G., Goggi S., Giampieri F., Baroni L. A review of mushrooms in human nutrition and health. *Trends in Food Science and Technology*. 2021. Vol. 117. P. 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.025>

22 Li M., Yu L., Zhao J., Zhang H., Chen W., Zhai Q., Tian F. Role of dietary edible mushrooms in the modulation of gut microbiota. *J Funct Foods*. 2021. Vol. 83. Art. ID 104538. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104538>

23 Yin C., Noratto G.D., Fan X., Chen Z., Yao F., Shi D., Gao H. The impact of mushroom polysaccharides on gut microbiota and its beneficial Effects to Host: A Review. *Carbohydrate Polymers*. 2020. Vol. 250. Art. ID 116942. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116942>

24 Yafetto L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*. 2022. Vol. 8(3). Art. ID e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

25 van Kuijk S.J.A., Sonnenberg A.S.M., Baars J.J.P., Hendriks W.H., Cone J.W. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnol Adv*. 2015. 33(1). P. 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014>

26 Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for *Pleurotus ostreatus* – Potential for combined mushroom and feed production. *J Clean Prod*. 2021. Vol. 313. Art. ID 127969. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127969>

27 Leong Y.K., Ma T.W., Chang J.S., Yang F.C. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. *Biores Technol*. 2022. Vol. 344(A). Art. ID 126157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126157>

28 Hernández D., Sánchez J.E., Yamasaki K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresource Technology*. 2003. Vol. 90(2). P. 145-150. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00118-4)

29 Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Oleinikova Y.A. The use of bacteria-producers of cellulose and organic acids for stimulation of growth of the mycelium of the oyster mushroom. *Int J Appl Fundam Res.* 2017. Vol. 10, Part 1. P. 102-105. <https://applied-research.ru/en/article/view?id=11870>

30 Pat. 030400 EАPO, A01G 1/04 (2006.01). Sposob podgotovki substrata dlja vyrashhivaniya micelija griba veshenka. Sadanov A.K., Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Sulejmenova Zh.B.; zajavitel' i patentoobladatel' RGP na PHV "Institut mikrobiologii i virusologii" KN MON RK (KZ). № 201500005; zajavl. 2014.09.25; opubl. 2018.07.31, Bjul. №07. – 5 s.

31 Kosel J., Ropret P. Overview of fungal isolates on heritage collections of photographic materials and their biological potency. *Journal of Cultural Heritage.* 2021. Vol. 48. P. 277-291. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.01.004>

32 Patel R., Mehta K., Prajapati J., Shukla A., Parmar P., Goswami D., Saraf M. An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes. *Biological Control.* 2022. Vol. 174. Art. ID 105012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105012>

33 Martínez M., Biganzoli F., Arata A., Dinolfo M.I., Rojas D., Cristos D., Stenglein S. Warm nights increase *Fusarium* Head Blight negative impact on barley and wheat grains. *Agricultural and Forest Meteorology.* 2022. Vol. 318. Art. ID 108909. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2022.108909>

34 Jayalal R.G.U., Adikaram N.K.B. Influence of *Trichoderma harzianum* metabolites on the development of green mould disease in the oyster mushroom. *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.).* 2007. Vol. 36. P. 53–60.

35 Kredics L., Kocsubé S., Nagy L., Komoń-Zelazowska M., Manczinger L., Sajben E., Nagy A., Vágvolgyi C., Kubicek C.P., Druzhinina I.S., Hatvani L. Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. Vol. 300. P. 58-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01765.x>.

36 Błaszczyk L., Siwulski M., Sobieralski K., Frużyńska-Jóźwiak D. Diversity of *Trichoderma* spp. causing *Pleurotus* green mould diseases in Central Europe. *Folia Microbiol. (Praha).* 2013. Vol. 58. P. 325–333. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0214-6>

37 Innocenti G., Montanari M., Righini H., Roberti R. *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz. *Plant Pathology.* 2019. Vol. 68, Issue2. P. 392-398.

38 Al-Ani B.M., Owaid M.N., Al-Saeedi S.S.S. Fungal interaction between *Trichoderma* spp. and *Pleurotus ostreatus* on the enriched solid media with licorice *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Acta Ecologica Sinica.* 2018. Vol. 38, Issue 3. P. 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.001>

FTAMP: 65.41.31

З.Ә. ҚОЖАХМЕТОВА^{1*}, К.А.МЫРЗАБЕК¹, Қ. СЕРІКБАЙ¹, М. АБДУЛЛАЕВА²¹Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан²Тәжікстан технологиялық университеті, Душанбе, Тәжікстан

*e-mail: zubaira.kozhahmetova@mail.ru

**ҚАЗАҚСТАННЫҢ ОҢТҮСТІК ӨңІРІНДЕ ДАЙЫНДАЛҒАН ШАРАПТАН
БӨЛІНІП АЛЫНҒАН АШЫТҚЫЛАРДЫҢ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ,
КУЛЬТУРАЛДЫҚ, ФИЗИОЛОГИЯЛЫҚ ЖӘНЕ БИОХИМИЯЛЫҚ
ҚАСИЕТТЕРІНІҢ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ**

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.05

Түйін

Бұл мақалада Қазақстанның Оңтүстік өңірінде дайындалған табиғи жағдайда өздігінен ашу арқылы алынған шараптан бөлініп алынған *Saccharomyces* туысына жататын жаңа ашытқы штамдарының әртүрлі қасиеттері зерттеліп, ерекшеліктері анықталды.

Кілтті сөздер: шарап, ашытқылар, қасиеттері, *Saccharomyces*.

Жүзім және жеміс—жидек ашытудағы басты рөл ашытқыларға тиесілі. Ашытқының әсерінен әрдайым піскен жидектер мен жемістердің (эпифитті микрофлораның) бетінде шырынды ашыту өздігінен пайда болуы мүмкін.

Жүзім шырыны тамаша қоректік орта болып табылады, өйткені құрамында оңай ашытылатын көмірсулар (глюкоза, фруктоза, сахароза), сондай-ақ азотты заттар мен витаминдер бар. Сондықтан шырынға әр түрлі микроорганизмдер, оның ішінде ашытқы, бактериялар дами алады, олар дәмін өзгертіп, дайын өнімнің сапасын төмендетуі мүмкін [1].

Өнеркәсіпте жағымсыз микрофлораны азайту үшін негізгі ашыту қоздырғышы ретінде бағалы өндірістік қасиеттері бар мәдени ашытқылар пайдаланылады:

- жақсы сапалы шарап алу үшін ашыту төмен температурада жүргені дұрыс. Сондықтан шарап ашытқысы суслонь 13 - 15°C ашыту керек;
- шарап ашытқылары спирттің жоғары концентрациясына (18% дейін) төзімді болуы тиіс. Спирттің көп мөлшерде пайда болуы инфекцияның дамуына кедергі келтіреді;
- көмірқышқыл газының жоғары қысымы кезінде қантты ашыту қабілеті болуы керек (ашыту соңында қысым 500 – 600 МПА жетеді);
- ашытқылар қышқылға төзімді болуы тиіс: ең тиімді ашыту 8-10 г/л титрленген қышқылдылықта шарап қышқылына қайта есептегенде жүреді;
- ашытқы түйіршікті және құрғақ тұнбаларды түзуге қабілеті;
- дрожжылар азотты заттардың жетіспеушілігі жағдайында ашытқыны ашыту қабілеті жоғары болуы керек.

Шарап ашытқылары *Saccharomycetaceae* тұқымдастарына, *Saccharomyces vini* және *Saccharomyces oviformis* түрлеріне жатады. Жасушалардың түрі мен өлшемдері даму жағдайлары мен қоректік ортаға байланысты. Көптеген жағдайларда шарап ашытқылары сопақ пішінді, споралы, өндірісте, негізінен, бөліну арқылы көбейеді.

Шарап ашытқыларының таза дақылдары шараптардың белгілі бір түрлеріне қарай бөлінген және сұрыпталған. Шарап ашытқысының таза культураларын жүзімнің стерильденген құрамында 16-20 % қант бар азотты қоректену суслосынан бөліп алады (қос фосфор қышқылды немесе хлорлы аммоний, аммиак ерітіндісі) [2].

Барлық ашытқы микроорганизмдері өзінің көбейіп-өсуі барысында құрамында тек қанты бар табиғи және жасанды дайындалған, қант көлемі әдетте 30-32% болатын қоректік орталарда қоректеніп, көбейеді. Бұндай ашытқылар әр түрлі қанттарды ашыту жолымен

қолданатын қасиетке ие. Сәйкесінше басқа микроорганизмдерге қарағанда, олардың сол өнімнің көмірсу алмасуында улылық әсеріне тұрақтылық қасиеті жоғары болады. *Saccharomyces* туыстығының ашытқылары үшін спирттік ашытудағы қант тек көмірсу түріндегі қорек көзі ғана емес, сонымен қатар оның ішіндегі басқа организмдермен тіршілік үшін күресі болып табылады [3, 4].

Saccharomyces vini - шарап ашытқыларының атауын И.Мейен (1838) алғаш ұсынған. Кейінірек оның *Saccharomyces ellipsoideus* Reess деген екінші атауы пайда болды. Сыра ашытқыларына қарағанда шарап ашытқылары эллипс формалы болады деп, түр классификациясының морфологиялық принципін енгізді. Бірақ оның тұжырымдамасы дәлелденбеді. Сондықтан шарап ашытқыларын сипаттауда В.И. Кудрявцев алғашқы атауын сақтап қалды. Культура өз-өзін ашытқан жүзім шырынынан бөлініп алынады. Бұндай ашытқылар кез-келген өз-өзін ашытқан жеміс-жидектер шырынынан алынуы мүмкін. Негізінен олар өнеркәсіптік және үй-жайлық шарап өндірісінде кездесетіні белгілі болды. Қазіргі кезде әртүрлі авторлардың сипаттаған шарап ашытқыларының барлығы В.И.Кудрявцев сипаттаған *Saccharomyces vini* түріне жатқызылған [5].

Зерттеудің мақсаты жергілікті ашытқы рассаларын шарап өндірісіне енгізу. Осы мақсатқа жету үшін алдымызға кейінгідей міндеттерді қойдық: өздігінен ашу арқылы алынған табиғи шараптан жаңа ашытқы штаммдарын бөліп алу, олардың морфологиялық, культуральдық, физиологиялық және биохимиялық қасиеттерін анықтау, түрге дейін ажыратып, физиологиялық қасиеттерімен ерекшеленетін штамдарға патент алу, оны өндіріске ұсыну.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу объектісі ретінде Түркістан облысы Түлкібас ауданы Балықшы елді мекенінде өсірілген жүзімнің «Қара жүзім» сортынан үй жағдайында дәстүрлі әдіспен өздігінен ашу арқылы алынған шараптан бөлініп алынған ашытқылардың 16 жаңа (1ZN, 2ZN, 3ZN, 4ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 8ZN, 9ZN, 10ZN, 11ZN, 12ZN, 13ZN, 14ZN, 15ZN, 16ZN) культуралдық штаммдары алынды.

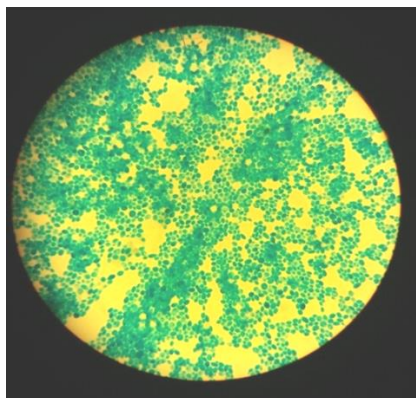
Зерттеу жұмысына микробиология бойынша қабылданған жалпы әдістер пайдаланылды [6]. Табиғи шараптан ашытқылардың таза культураларын бөліп алу үшін Сабур қоректік ортасын пайдаландық. Бөліп алынған ашытқылардың жаңа 16 культураларының морфологиялық, культуральдық, физиологиялық және биохимиялық қасиеттері зерттелініп, түрге дейін ажыратылды. Дрожжылардың морфологиялық белгілерін метилен көгі бояуымен бояп, Motic BA200 маркалы бинокулярлық микроскопында, культуральдық қасиеттерін Сабур, сусло, ет пептонды сорпа, ет пептонды агар орталарында өсуінің сипатына қарап анықтадық. Биохимиялық қасиеттерін Гисс ортасына 1% көмірсудың бірнеше түрін (глюкоза, галактоза, лактоза, сахароза, раффиноза, мальтоза, декстрин, инулин, ксилоза, арабиноза, глицерин, сорбит, дульцит) қосып, түсінің өзгеруіне қарай көмірсуларды ыдырату қабілетін анықтадық. Органикалық қышқылдардан сүт және сірке қышқылын ыдыратуына зерттедік. Ашытқылардың физиологиялық қасиеттерін, оның ішінде қанттың 40, 55% концентрациясын ашытуы, тұздың 2, 5, 7% және этил спиртінің 18% концентрацияларына тұрақтылығы, рН-тың әр түрлі параметрлерінде өсуін сұйық Сабур ортасында зерттедік. Культураларды термостатта 28-30° С температурада өсірдік. Бір тәуліктен кейін жалпы қышқылдылығын индикатор ретінде фенолфталеиннің 1% спирттік ерітіндісі және титрлеу үшін NaOH-тың 0,1н ерітіндісі пайдаланылды. Дрожжылардың сахарозаны ашытуы және тұзға тұрақтылығы сұйық қоректік ортада түзген қышқылдылық көрсеткішімен анықталды. Ашытқы штамдарының этил спиртінің 18% концентрациясына тұрақтылығын олардың қоректік ортада өсу қарқындылығына қарай анықтадық.

Нәтижелер және оларды талқылау

Біздің табиғи жүзім шарапынан бөліп алған ашытқылардың морфологиялық белгілері шар тәрізді болды. Жасушалардың өлшемдері 5-7 x 8-10 мкм. (1-сурет).

Сабуρο қатты қоректік ортасының бетінде ашытқы колонияларының шеті тегіс, беті дөнес, түсі ашық қоңырқай, консистенциясы жағылғыш, ылғалды болды. Сұйық қоректік ортада өскенде пробирка түбінде көп мөлшерде тұнба, бетінде пленка түзіп, аздап лайқыланады (2-сурет).

Культуралар Сабуро қоректік орталарынан бөліп алғаннан кейін ет пептонды агарда да тұтас спора түзеді. Споралары шар тәрізді болды. Спораларының көлемі 2,5-3 мкм. Вегетативті көбею арқылы қолайлы жағдай туғанда споралар қайтадан бөлінгіш клеткаларға айналады.



1 сурет - Шарап ашытқы клеткасының микроскоптық бейнесі, 1000 есе үлкейтілген



2 сурет - Петри аяқшасында Сабуро қоректік ортаның бетіндегі өсіндісі

Барлық бөлініп алынған ашытқы штаммдары сұйық қоректік ортада ашу көмегімен, ал қатты қоректік ортада глюкоза, галактоза, сахароза, раффиноза, мальтозаның қышқылдандыру арқылы жақсы дамыды. Декстрин, лактоза, инулин, ксилоза, арабинозалармен қоректен алмайды. Спирттерден этил спирті мен глицеринді ашыта алады, ал сорбит және дульцитті ашытпайды. Органикалық қышқылдардан сүт қышқылы мен сірке қышқылын жақсы ыдыратады.

Лоддердің және Кудрявцевтің анықтамалығы бойынша бөліп алынған культуралардың барлығы морфологиялық, культуральдық, физиологиялық және биохимиялық қасиеттеріне қарап *Saccharomyces vini* түріне жатқызылды (сілтеме Қожахметова З.А.) [5].

Табиғи шараптан бөлініп алынған ашытқы культураларының сахарозаның 40, 50% концентрациясында өсу көрсеткіштері 1-кестеде берілген.

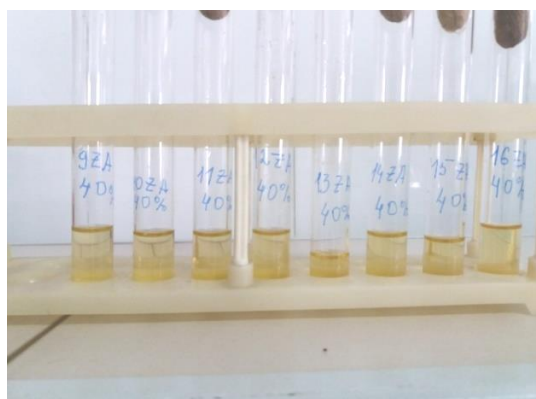
Кесте 1 - Ашытқы культураларының сахарозаның әр түрлі концентрацияларында өсу көрсеткіштері

Штамм №	1 тәуліктегі жалпы қышқылдық саны, °Тернер	
	Сабур 40% сахарозамен	Сабур 50% сахарозамен
1	2	3
1ZN	52	48
2ZN	50	40
3 ZN	60	49
4 ZN	55	50
5 ZN	40	60
6 ZN	60	55
7 ZN	49	60
8 ZN	59	50

Кесте - 1 жалғасы

1	2	2
9 ZN	62	60
10 ZN	59	60
11 ZN	50	45
12 ZN	45	41
13 ZN	68	55
14 ZN	60	53
15 ZN	72	55
16 ZN	55	50

Шарап ашытқылары сахарозаның әр түрлі концентрациясында 3ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN жақсы дамып, қоректік орта лайқыланды және 41-72 °Т аралығында қышқыл бөліп, ауа көпіршіктері үздіксіз пайда болды (3 сурет). Этил спиртінің 18 % концентрациясындағы қоректік ортада ашытқылардың жаңа штамдарының 50% қарқынды өсуі байқалды.



3 сурет - Ашытқы культураларының сахарозаны ашытуы

Saccharomyces vini культуралары қымыздан бөлінген дрожжылардың *Saccharomyces lactis* түрлерімен салыстырғанда сахарозаны ашыту қабілеттілігі жоғары болды [4, 5].

Ал дрожжылардың Сабуро ортасында тұздың 2, 5, 7% және этил спиртінің 18% концентрациясында өсу нәтижелері 2-кестеде көрсетілген.

Кесте 2 - Ашытқылардың жаңа штамдары тұздың 2, 5, 7% және спирттің 18% концентрациясында өсу нәтижелері

Штамм №	Сабур ортасында тұздың әртүрлі концентрациясында 1 тәулікте өсуі			Сабур ортасында 18% спирт концентрациясында өсуі
	2%	5%	7%	
1	2	3	4	5
1ZN	+	+	-	-
2ZN	+	+	-	-
3 ZN	+	+	+	+
4 ZN	+	+	+	+
5 ZN	+	+	+	+
6 ZN	+	+	+	+
7 ZN	+	+	-	-
8 ZN	+	+	-	-
9 ZN	+	+	+	+
10 ZN	+	+	+	+

Кесте - 2 жалғасы

1	2	3	4	5
11 ZN	+	+	-	-
12 ZN	+	+	-	-
13 ZN	+	+	+	+
14 ZN	+	+	-	-
15 ZN	+	+	+	+
16 ZN	+	+	-	-

Ал 2 % және 5 % тұз концентрациясында барлық ашытқы штаммдары тұрақты, ал 7 % тұз концентрацияларында 3ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN штаммдары ғана тұрақты қасиет көрсеткен. *Saccharomyces vini* ашытқысына тән ерекшелігі - олардың айтарлықтай спиртке төзімділігі. Этил спиртінің 18 % концентрациясында жоғарыда аталған 3ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN штамдары жоғары төзімділік қасиет көрсетті.

Қорытынды

Лоддердің және Кудрявцевтің анықтамалығы бойынша бөліп алынған культуралардың барлығы *Saccharomyces vini* түріне жататындығы белгілі болды. Жалпы алғанда, өздігінен ашу арқылы алынған шарап дрожжылары сахарозаның әр түрлі концентрациясын жақсы ашыта алады және ашыту деңгейіне байланысты бір-бірінен айырмашылығы бар.

Табиғи шараптан бөлініп алынған ашытқылардың жаңа штамдары 2%, 5% тұз концентрациясында тұрақты, ал тұздың 7 % және этил спиртінің 18 % концентрациясында 3ZN, 4ZN, 6ZN, 5ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN штамдары төзімділік қасиет көрсетті.

Әдебиеттер:

- 1 Еремина И.А., Лузина Н.И., Кригер О.В. Микробиология продуктов растительного происхождения. Уч.пособие, Кемерово, 2003.- 87 с.
- 2 Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. М.: ДеЛи принт, 2003, 800 с.
- 3 Кожахметова З.А., Толысбаев Б.Т., Дуйсембаев К.И. Физиологические особенности дрожжей кумысного брожения. Материалы международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки и практики» посвященной государственной программе «АУЛ», КазНИВИ. Алматы, 10 сентября 2003. - С.143-148.
- 4 Кожахметова З.А. Видовая характеристика дрожжей выделенных из кобыльего молока, жидкой народной закваски и кумыса. Исследования, результаты, КазНАУ. Алматы, 2003. - №3, 4. С.35-39.
- 5 Кожахметова З.А. Изучение биологических свойств специфических штаммов микроорганизмов и их использование при изготовлении кумыса. Дисс.на соискание уч.ст.канд. 2008. КазНИВИ. Алматы. 133с.
- 6 Бочарова Н.Н., Кобрина Ю.П., Розманова Н.В. Микрофлора дрожжевого производства. - М.: - Пищев. пром. - 1972. - 150 с.

З.А. КОЖАХМЕТОВА^{1*}, К.А. МЫРЗАБЕК¹, К. СЕРИКБАЙ¹, М. АБДУЛЛАЕВА²

¹Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

²Таджикистанский технологический университет, Душанбе, Таджикистан

*e-mail: zubaira.kozhahmetova@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, КУЛЬТУРАЛЬНЫХ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДРОЖЖЕЙ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВИНА ИЗГОТОВЛЕННОГО ЮЖНОМ РЕГИОНЕ КАЗАХСТАНА

Аннотация

В данной статье определены особенности, исследованы различные свойства новых штаммов дрожжей, принадлежащих к роду *Saccharomyces*, выделенных из вина, полученного методом естественного самоброжения в южном регионе Казахстана.

Ключевые слова: вино, дрожжи, свойства, *Saccharomyces*.

IRSTI: 65.41.31

Z.A. KOZHAKHMETOVA^{1*}, K.A. MYRZABEK¹, K.SERIKBAY¹, M. ABDULLAEVA²

¹Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

²Tajikistan Technological University, Dushanbe, Tajikistan

*e-mail: zubaira.kozhahmetova@mail.ru

FEATURES OF MORHOLOGICAL CULTURAL PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF YEAST ISOLATED FROM WINE PRODUCED IN THE SOUTHERN REGION OF KAZAKHSTAN

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.05

Abstract

In this article, various properties and features of new yeast strains belonging to the genus *Saccharomyces*, isolated from wine obtained by self-discovery in natural conditions prepared in the southern region of Kazakhstan, were studied and identified.

Keywords: wine, yeast, properties, *Saccharomyces*.

The main role in grape and fruit fermentation belongs to yeasts. Under the influence of yeast, juice fermentation can occur spontaneously on the surface of usually ripe berries and fruits (epiphytic microflora).

Grape juice is an excellent nutrient medium, as it contains easily fermentable carbohydrates (glucose, fructose, sucrose), as well as nitrogenous substances and vitamins. Therefore, various microorganisms can develop in the juice, including yeast, bacteria, which can change the taste and reduce the quality of the finished product [1].

In industry, cultivated yeasts with valuable industrial properties are used as the main fermentation stimulant to reduce negative microflora:

- To obtain a good quality wine, it is better that fermentation takes place at a low temperature. Therefore, the wine yeast wort must be fermented at 13-15°C;

- Wine yeast must be resistant to high alcohol concentrations (up to 18%). A large amount of alcohol prevents the development of infection;

- must have the ability to ferment sugar at high carbon dioxide pressure (at the end of fermentation, the pressure reaches 500-600 MPa);

- Yeasts must be acid-resistant: the most effective fermentation takes place at a titrated acidity of 8-10 G/L with a conversion to tartaric acid;

- Ability of yeast to form granular and dry tinctures;
- Yeasts should have a high ability to ferment yeast in conditions of a lack of nitrogenous substances.

Wine yeasts belong to the *Saccharomycetaceae* family, the species *Saccharomyces vini* and *Saccharomyces oviformis*. The type and size of cells depends on the conditions of development and the nutrient medium. In most cases, wine yeast is oval, spore bearing, reproducing in production, mainly by division.

Pure wine yeast cultures are divided and sorted according to certain types of wines. Pure cultures of wine yeast are isolated from nitrogenous feeding wort with a sterilized grape content of 16-20% sugar (double phosphoric acid or ammonium chloride, ammonia solution) [2].

In the process of their reproduction, all yeast microorganisms feed and multiply in natural and artificially prepared culture media containing only sugar, the volume of sugar is usually 30-32%. Such yeasts have the ability to use different sugars by fermentation. Accordingly, they have a higher property of resistance to toxic effects in carbohydrate metabolism of the same product than other microorganisms. For yeasts of the genus *Saccharomyces*, sugar in alcoholic fermentation is not only a food source in the form of a carbohydrate, but also its struggle for survival with other organisms within it [3, 4].

I. Meyen (1838) first proposed *Saccharomyces vini* – the name of wine yeast. Later, its second name *Saccharomyces ellipsoideus* Reess appeared. He introduced the morphological principle of species classification, claiming that wine yeasts are more elliptical in shape than beer yeasts. However, his concept has not been proven. Therefore, in the description of wine yeasts, V. I. Kudryavtsev retained the original name. The culture is separated from the self-fermented grape juice. Such yeast can be obtained from any self-fermented fruit juice. It turned out that mainly they are found in industrial and indoor wine production. Currently, all wine yeasts described by various authors are attributed to the type *Saccharomyces vini*, described by V. I. Kudryavtsev [5].

The purpose of the study is to introduce local yeast Russes into the production of wine. To achieve this goal, we set ourselves the same tasks as after: to isolate new yeast strains from natural wine obtained by self-discovery, to determine their morphological, cultural, physiological and biochemical properties, to distinguish them by type and obtain a patent for strains that differ in physiological properties, to present them for production.

Materials and methods

As the object of the study, 16 new (1ZN, 2ZN, 3ZN, 4ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 8ZN, 9ZN, 10ZN, 11ZN, 12ZN, 13zn, 14zn, 15ZN, 16zn) cultural strains of yeast extracted from wine obtained by self-opening by traditional method at home from the "black grapes" grape variety grown in the Balykshi settlement of Tulkubas District of Turkestan region were obtained.

The general methods adopted in Microbiology were used in the research work [6]. We used the Saburo nutrient medium to extract pure yeast cultures from natural wine. Morphological, cultural, physiological and biochemical properties of 16 new cultures of isolated yeasts were studied and differentiated into species. We painted the morphological features of yeasts with methylene blue paint and determined the culture properties under a binocular microscope of the Motic BA200 brand by looking at the nature of growth in Saburo, wort, meat peptone broth, meat peptone agar media. Biochemical properties we determined the ability to break down carbohydrates by adding several types of 1% carbohydrates (glucose, galactose, lactose, sucrose, raffinose, maltose, dextrin, inulin, xylose, arabinose, glycerin, sorbitol, dulcitol) to the his medium. We studied the decomposition of lactic and acetic acid from organic acids. We studied the physiological properties of yeast, including fermentation of sugar concentrations of 40, 55%, resistance to salt concentrations of 2, 5, 7% and ethyl alcohol concentrations of 18%, increase in pH at different parameters in a liquid Saburo medium. We grew the crops at a temperature of 28-30° C on the thermostat. After a day, a 1% alcohol solution of phenolphthalein was used as an indicator of total acidity and a 0.1 n solution of NaOH for titration. The fermentation of sucrose by yeasts and the resistance to salt.

Results and their discussion

The morphological features of the yeast that we isolated from our natural grape wine were spherical. The dimensions of the cells are 5-7 x 8-10 microns. (Figure 1).

On the surface of the solid culture medium of Saburo, the edge of the yeast colonies was smooth, the surface was convex, the color was light brown, and the consistency was smeared, moist. When growing in a liquid nutrient medium, a large amount of sediment forms at the bottom of the test tube, a film on the surface, and slightly silts (Figure 2).

After being isolated from Saburo culture media by cultures, the meat also forms a whole spore in peptone Agar. The spores were spherical. The volume of Spores is 2.5-3 μ . When favorable conditions are created by vegetative reproduction, the spores become dividing cells again.

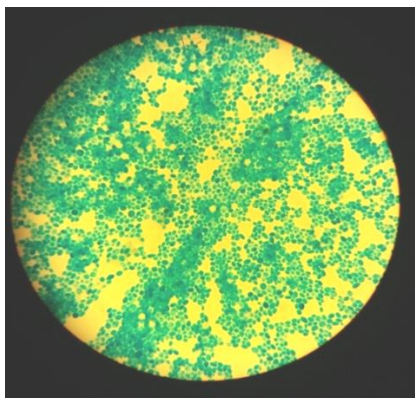


Figure 1 – Microscope image of a wine yeast cell, 1000X magnified



Figure 2 - Growth of yeast colonies on Petri in Saburo medium

All isolated yeast strains developed well in a liquid culture medium by fermentation, and in a solid culture medium by acidification of glucose, galactose, sucrose, raffinose, maltose. It cannot feed on dextrin, lactose, inulin, xylose, arabinoses. From alcohols, it can ferment ethyl alcohol and glycerin, while sorbitol and dulcitol do not ferment. From organic acids, it breaks down lactic acid and acetic acid well.

According to the reference books of Lodder and Kudryavtsev, all cultures were classified as *Saccharomyces vini*, based on morphological, cultural, physiological and biochemical properties (reference Kozhakhmetova Z. A.) [5].

Indicators of growth of yeast cultures isolated from natural wine at a concentration of 40, 50% of sucrose are presented in Table 1.

Table 1 – growth rates of yeast cultures at different concentrations of sucrose

Strain no.	Total acidity number for 1 day, °Turner	
	Saburo with 40% sucrose	Saburo with 50% sucrose
1	2	3
1ZN	52	48
2ZN	50	40
3 ZN	60	49
4 ZN	55	50
5 ZN	40	60
6 ZN	60	55
7 ZN	49	60
8 ZN	59	50
9 ZN	62	60
10 ZN	59	60

Table 1 continuation

1	2	3
11 ZN	50	45
12 ZN	45	41
13 ZN	68	55
14 ZN	60	53
15 ZN	72	55
16 ZN	55	50

Wine yeast developed well at different concentrations of sucrose 3ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN, the nutrient medium was silted up and formed air bubbles continuously, releasing acid between 41-72 °t (figure 3). In the nutrient medium at a concentration of 18% of ethyl alcohol, there was an intensive growth of 50% of new strains of yeast.

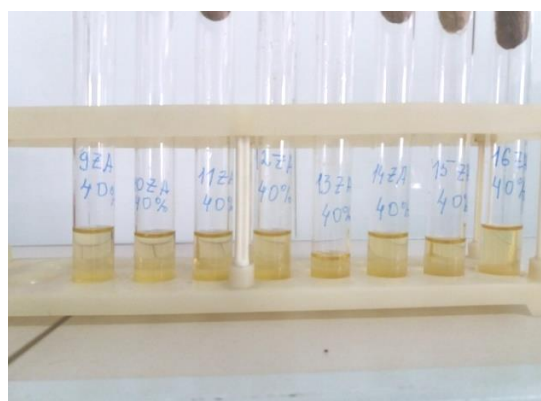


Figure 3 – Sucrose fermentation by yeast cultures

The cultures of *Saccharomyces vini*, separated from kombucha, had a higher ability to ferment sucrose compared to the species of *Saccharomyces lactis* [4, 5].

And the results of the growth of drozhzhi in the Saburo medium at a concentration of 2, 5, 7% of salt and 18% of ethyl alcohol are shown in Table 2.

Table 2-new yeast strains growth results at concentrations of 2, 5, 7% salt and 18% alcohol

Strain no.	Growing in a Saburo medium at different concentrations of salt in 1 day			Growth at an alcohol concentration of 18% in the middle of Saburo
	2%	5%	7%	
1ZN	+	+	-	-
2ZN	+	+	-	-
3 ZN	+	+	+	+
4 ZN	+	+	+	+
5 ZN	+	+	+	+
6 ZN	+	+	+	+
7 ZN	+	+	-	-
8 ZN	+	+	-	-
9 ZN	+	+	+	+
10 ZN	+	+	+	+
11 ZN	+	+	-	-
12 ZN	+	+	-	-
13 ZN	+	+	+	+
14 ZN	+	+	-	-
15 ZN	+	+	+	+
16 ZN	+	+	-	-

And at salt concentrations of 2% and 5%, all yeast strains were stable, and at salt concentrations of 7%, only strains of 3ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN showed stable properties. A characteristic feature of yeast *Saccharomyces vini* is their significant alcohol resistance. At a concentration of 18% of ethyl alcohol, the above-mentioned strains of 3ZN, 5ZN, 6ZN, 7ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN showed high resistance properties.

Conclusion

It turned out that all the cultures isolated according to Lodder's and Kudryavtsev's reference books belonged to the type *Saccharomyces vini*. In general, wine droppings obtained by self-opening can well ferment different concentrations of sucrose and differ from each other depending on the level of fermentation.

New strains of yeast isolated from natural wine are stable at a concentration of 2%, 5% salt, and at a concentration of 7% salt and 18% ethyl alcohol, strains of 3ZN, 4ZN, 6ZN, 5ZN, 9ZN, 10ZN, 13ZN, 15ZN showed resistance.

References:

- 1 Yeremina I.A., Luzina N.I., Kriger O.V. Mikrobiologiya produktov rastitel'nogo proiskhozhdeniya. Uch.posobiye, Kemerovo, 2003.- 87 P.
- 2 Gudkov A.V. Syrodeliye: tekhnologicheskiye, biologicheskiye i fiziko-khimicheskiye aspekty. M.: DeLi print, 2003, 800 p.
- 3 Kozhakhmetova Z.A., Tolysbayev B.T., Duysembayev K.I. Fiziologicheskiye osobennosti drozhzhey kumysnogo brozheniya. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sostoyaniye i perspektivy razvitiya veterinarnoy nauki i praktiki» posvyashchennoy goudarstvennoy programme «AUL», KazNIVI. Almaty, 10 sentyabrya 2003 g. - P.143-148.
- 4 Kozhakhmetova Z.A. Vidovaya kharakteristika drozhzhey vydelennykh iz kobyl'yego moloka, zhidkoy narodnoy zakvaski i kumysa. Issledovaniya, rezul'taty, KazNAU. Almaty, 2003. - №3, 4. P.35-39.
- 5 Kozhakhmetova Z.A. Izucheniye biologicheskikh svoystv spetsificheskikh shtammov mikroorganizmov i ikh ispol'zovaniye pri izgotovlenii kumysa. Diss.na soiskaniye uch.st.kand. 2008. KazNIVI. Almaty. 133 P.
- 6 Bocharova N.N., Kobrina YU.P., Rozmanova N.V. Mikroflora drozhzhevogo proizvodstva. - M.: - Pishchev. prom. - 1972. – 150 P.

МРНТИ: 34.25.29

А.Р. ӘБДИМҰХТАР*, Г.Д. НАХАНОВА, Ж.К. КОШЕМЕТОВ, Б.К. УМИРАЛИЕВ,
Н.К. ОРАЗЫМБЕТОВА, Ш.С. ТҰРЫСКЕЛДІ, С.Ш. НУРАБАЕВ

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Казахстан

*e-mail: azamat_95.96@mail.ru

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.06

Аннотация

Вирус чумы плотоядных является высококонтагиозным патогеном, который характеризуется лихорадкой, пневмонией, воспалением слизистых оболочек, лейкопенией и поражением центральной нервной системы, приводящей часто к летальному исходу. К этой болезни восприимчивы все собаки, независимо от породы, норки, песцы, волки, лисицы, тюлени, тигры и т.д. В последние годы межвидовые инфекции чумы плотоядных наблюдались у нечеловекообразных приматов, включая выведенных и диких макак-резусов и яванских макак. Смертность от чумы плотоядных у макак-резусов достигает 5–30%. Несмотря на почти столетнюю историю борьбы с этой инфекцией остаются актуальными вопросы диагностики, профилактики и специфического лечения. Учитывая важность этой проблемы, для разработки диагностических или профилактических средств необходимо наработать высокоактивную вирусную биомассу. В связи с этим, наши исследования посвящены изучению культуральных свойств и определению оптимальных условий культивирования вируса чумы плотоядных.

В результате исследований наиболее оптимальной для размножения вируса чумы плотоядных нами выбрана культура клеток Vero. При этом ЦПД вируса развивается через 48–56 часов с титром вируса $6,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Также определены оптимальные параметры культивирования вируса чумы плотоядных в культуре клеток Vero.

Ключевые слова: чума плотоядных, культура клеток, культивирование, адаптация вируса.

Чума плотоядных – высококонтагиозное повсеместно распространённое заболевание, сопровождающееся высокой температурой, воспалением слизистых оболочек органов дыхания и зрения, и поражением центральной нервной системы [1]. Чума известна со времён одомашнивания собак. Возбудитель чумы плотоядных - РНК-содержащий вирус, имеющий на своей поверхности два белка-антигена Н и F. Вирус чумы плотоядных входит в семейство *Paramyxoviridae*, род *Morbillivirus*. К этой же группе относится вирус кори человека, чумы крупного рогатого скота и возбудители ряда других болезней [2, 3].

Важно отметить, что недавно возникли вспышки чумы плотоядных с высокой смертностью среди нечеловекообразных приматов. Крупная вспышка чумы плотоядных произошла у макак-резусов на племенной ферме в провинции Гуанси в 2006 г., за которой последовала еще одна вспышка у макак-резусов в Центре животных в Пекине в 2008г. Смертность от чумы плотоядных у макак-резусов достигает 5–30%. В связи с этим, в будущем есть вероятность передачи вируса от животных к человеку [4, 5].

Чума плотоядных может протекать молниеносно, сверхостро, остро, подостро, абортивно, типично и атипично. По клиническим признакам различают катаральную, лёгочную, кишечную, кожную, нервную и смешанную (генерализованную) формы болезни. Развитие той или иной формы чумы определяется реактивностью организма животного. Один и тот же штамм возбудителя может вызывать у животных разнотипные клинические признаки [6].

Несмотря на почти столетнюю историю борьбы с этой инфекцией, остаются актуальными вопросы диагностики, профилактики и специфического лечения. Для

разработки диагностических и профилактических средств необходимо наработать высокоактивную вирусную биомассу. Современные требования, предъявляемые к эффективности и безопасности ветеринарных препаратов, а также их качественного производства с соблюдением правил GMP, приводят к совершенствованию технологий изготовления вакцинных препаратов, создание которых сводится к культивированию вакцинных штаммов различных вирусов в перевиваемой клеточной линии. Определение оптимальных условий культивирования вируса является важнейшей характеристикой вирусодержащей суспензии, пригодной для изготовления средств специфической профилактики. Получение вируса с наибольшей биологической и антигенной активностью позволяет разрабатывать противовирусные препараты с высокой иммуногенной активностью. Исходя из этого, целью данного исследования является выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных.

Материалы и методы

Штаммы вирусов. В работе использовали штаммы «ЛД» и «Вакчум» вируса чумы плотоядных.

Выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных. По данным многочисленных исследователей для культивирования вируса чумы плотоядных используются как первичные, так и перевиваемые клеточные культуры [9, 10].

Адаптацию вируса чумы плотоядных к культуре клеток проводили с использованием следующих клеточных линий: первично-трипсинизированных – ПТ и ПЯ, а также перевиваемых линий культур клеток – Vero, ВНК-21, СПЭВ, IB-RS-2 и ПО, выращенных в пробирках. Для адаптации штамма «ЛД» и «Вакчум» вируса чумы плотоядных к линии клеток проведено 6 последовательных пассажей вируса на вышеперечисленных культурах.

Для изучения влияния качества поддерживающей питательной среды на размножение вируса чумы плотоядных нами были испытаны имеющиеся в НИИПББ питательные среды ПСП, ДМЭМ и Игла. С целью определения влияния концентрации сыворотки на размножение вируса чумы плотоядных в культурах клеток были испытаны 1, 2, 5 и 10% концентрации фетальной сыворотки телят в поддерживающей среде.

Определение биологической активности штамма вируса чумы плотоядных в испытанных системах культивирования. Для определения оптимальной заражающей дозы вируса чумы плотоядных, при которой происходит наибольшее его накопление, были испытаны дозы вируса от 0,01 до 1 ТЦД₅₀/кл. По достижению цитопатического действия в монослое культуры клеток на 85–90% матрасы подвергались двум циклам замораживания-оттаивания в пределах от минус 40 °С до комнатной температуры. Сбор вирусодержащих материалов (ВСМ) каждого пассажа проводился в асептических условиях в стерильные флаконы. Одновременно из каждого флакона с ВСМ отбирались пробы для определения биологической активности вируса в соответствии с методом. Титр вируса был рассчитан с использованием метода Reed I.J. и Muench H. А и были указаны в lg ТЦД₅₀/см³ [7]. Стерильность ВСМ каждого пассажа определена согласно ГОСТ 28085–2013 [8].

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с вычислением среднего арифметического значения (X) и средней квадратической ошибки (m) при помощи компьютерной программы "Microsoft Excel" и GraphPad Prism версии 8.0.1. Цифровые данные подвергали статистическому анализу с определением средних величин и их ошибок непосредственным и разностным методом по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Выбор оптимальной системы культивирования вируса чумы плотоядных

С использованием вышеперечисленных культур клеток проведено по 6 последовательных пассажей. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Адаптация вируса к различным культурам клеток

Наименование культуры клеток	Вирус/штамм	Пассажный уровень					
		1	2	3	4	5	6
ПЯ	ЧП «ЛД»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
ПТ	ЧП «ЛД»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Vero	ЧП «ЛД»	+ - - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
ВНК-21	ЧП «ЛД»	- - - -	+ - - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
СПЭВ	ЧП «ЛД»	- - - -	- - - -	- - + +	- + + +	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
IB-RS-2	ЧП «ЛД»	- - - -	- - - -	+ - - -	+ + + -	+ + + +	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	- - - -	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +
ПО	ЧП «ЛД»	- - - -	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +
	ЧП «Вакчум»	- - - -	+ - - -	+ + - -	+ + + +	+ + + +	+ + + +
Примечания: 1 «+ - - -» – появления ЦПД на 25%; 2 «+ + - -» – появления ЦПД на 50%; 3 «+ + + -» – появления ЦПД на 75%; 4 «+ + + +» – появления ЦПД на 100%; 5 «- - - -» – отсутствие ЦПД.							

Как видно из результатов таблицы 1, вирус чумы плотоядных адаптируется к культурам клеток ПТ, ПЯ, Vero, ВНК-21 и СПЭВ на 3 пассажном уровне. Более длительная, на 4 пассажном уровне, адаптация была к культурам клеток перевиваемой линии IB-RS-2 и ПО.

В культурах клеток ПЯ, ПТ, Vero и ВНК-21 ЦПД вируса развивалось через 48–56 час после заражения, деструкция монослоя и его отслоение от стекла наблюдались через 72 часа. В культурах клеток СПЭВ IB-RS-2 и ПО ЦПД вируса развивалось через 72 часа. Размножение вируса сопровождалось вначале очаговым, а позднее, после 96 часов, почти полным разрушением клеточного монослоя.

Таким образом, проведенные исследования показали, что все испытанные культуры клеток чувствительны к вирусу чумы плотоядных. Следует отметить, что более четко выраженное и раннее ЦПД вируса чумы плотоядных наблюдается в культуры клеток ПЯ и Vero. Отмечено также, что удовлетворительными характеристиками обладают культуры клеток ПТ и СПЭВ.

Отработка оптимальных параметров получения активного вирусосодержащего материала в выбранных системах культивирования.

Результаты по определению биологической активности штамма вируса в испытанных системах культивирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Биологическая активность вируса чумы плотоядных, в различных культурах клеток

Наименование культуры клеток	Количество опытов	Биологическая активность вирусов в культуре клеток, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (M±m)	
		Штамм «ЛД»	Штамм «Вакчум»
ПЯ	3	5,75±0,11	5,31±0,08
ПТ	3	5,00±0,14	4,73±0,12
Vero	3	6,25±0,11	5,75±0,12
ВНК-21	3	5,0±0,07	4,77±0,11
СПЭВ	3	4,5±0,10	4,43±0,09
ПО	3	4,03±0,09	3,77±0,11

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что наиболее приемлемой культурой клеток для определения биологической активности является культуры клеток ПЯ и Vero. При этом биологическая активность вируса составляет 5,75–6,25 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно.

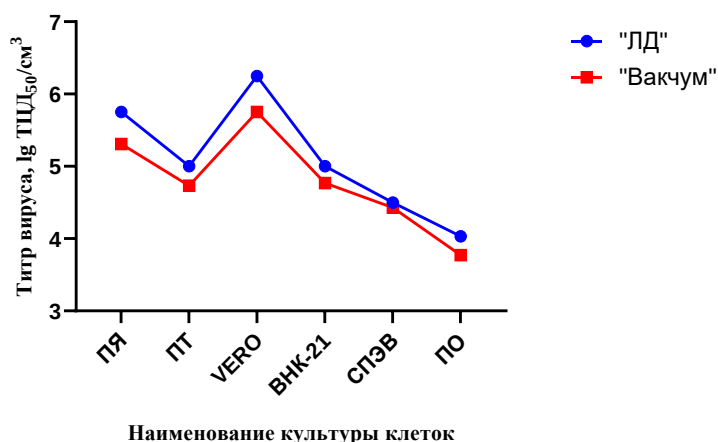


Рисунок 1 - Биологическая активность вируса чумы плотоядных в различных культурах клеток

Для определения оптимальной заражающей дозы вируса чумы плотоядных, при которой происходит наибольшее его накопление, нами были испытаны дозы вируса от 0,01 до 1 ТЦД₅₀/кл., которыми заражали культуру клеток Vero. Сбор вирусного сырья производили через 72–96 часов после заражения. Биологическую активность вирусного материала определяли путем титрования проб в культуре клеток Vero.

В результате проведения этих исследований установлено, что наибольшее накопление вируса чумы плотоядных в культуре клеток (6,25 lg ТЦД₅₀/см³) происходит при заражающей дозе 0,1–0,5 ТЦД₅₀/кл., а оптимальным сроком сбора вирусного материала является 96 часов.

Для изучения влияния качества поддерживающей питательной среды на размножение вируса чумы плотоядных испытаны имеющиеся в НИИПББ питательные среды: ПСП, ДМЭМ и Игла. В результате проведенных исследований установлено, что питательная среда Игла и ПСП через 48–72 часов снижала свое рН и вызывала резкое замедление размножения вируса и омертвление монослоя клеток. Среда ДМЭМ на протяжении 8–10 суток не оказывала влияние на монослой клеток и способствовала размножению вируса чумы плотоядных в испытанных культурах клеток через 72–96 часов. ЦПД вируса на культуре клеток Vero представлено на рисунке 2.

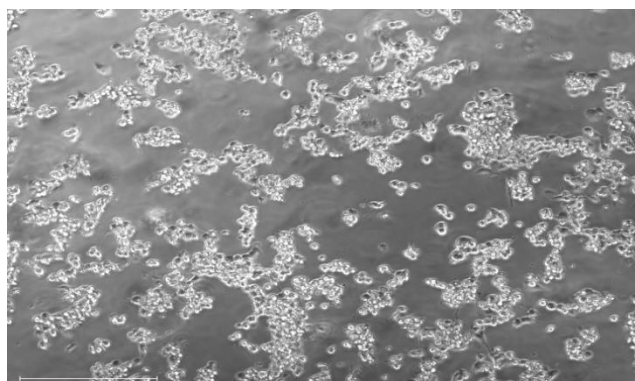


Рисунок 2 – Цитопатическое действие вируса чумы плотоядных в культуре клеток Vero (ув. x 100).

С целью определения влияния концентрации сыворотки на размножение вируса чумы плотоядных в культурах клеток испытаны 1, 2, 5 и 10% концентрации фетальной сыворотки телят в поддерживающей среде. В результате проведенных исследований установлено, что 1 % содержание сыворотки не способствовало быстрому накоплению вируса, ЦПД вируса было слабое, деструкции монослоя не наступало. В дальнейших исследованиях было определено, что оптимальной оказалась 2 % концентрация сыворотки.

Вирусные болезни плотоядных причиняют значительный ущерб пушному звероводству, домашнему и служебному собаководству. Наиболее опасным из них является чума плотоядных. Первые вспышки этих болезней появились в Азии 3000 лет назад, а затем распространились на Ближний Восток, а затем в Европу. В России чуму собак впервые зарегистрировали в 1762 г. в Крыму и назвали её "крымская болезнь", затем в 1770 г. её обнаружили в Москве [9]. На территории Республики Казахстан чума плотоядных встречается повсеместно. Анализ литературы показывает, что данное заболевание в стране в разные годы регистрировали среди собак различных пород, норок, тхорзофредок, песцов, лис и тюленей. [10, 11].

Вирус чумы плотоядных может быть адаптирован к куриным эмбрионам и культивироваться в них при заражении на хорионаллантоисную оболочку. В оболочке появляются сероватые фокусы и тяжи, в результате эмбрионы гибнут. Заражение эмбрионов внесением вирусосодержащего материала в желточный мешок ведёт к гибели их на 7-11-е сутки после заражения [12]. Из литературных данных известно, что вирус чумы плотоядных активно размножается в первичных культурах клеток почки и легких собак, хорьков, слизистой оболочки мочевого пузыря собак, а адаптированные штаммы - в клетках куриного эмбриона и в перевиваемых клетках - MDBC, Vero и др [13]. Цитопатическое действие вируса проявляется образованием синцития через 7–14 дней после заражения монослоя [14]. Вирус после адаптации возможно культивировать на 3–6-месячных хорьках и 6–12-месячных щенках собак.

По результатам наших исследований вирус чумы плотоядных адаптирован к культурам клеток ПТ, ПЯ, Vero, ПП, ВНК-21, СПЭВ, IB-RS-2, ПО, начиная с 3-го пассажного уровня, вызывает ЦПД через 48–72 часов. Наиболее оптимальной системой для размножения вируса чумы плотоядных нами признана культура клеток Vero. ЦПД вируса развивается через 48–56 часов, титр вируса составил $6,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Определены основные параметры (заражающая доза, концентрация сыворотки, питательная среда) культивирования вируса чумы плотоядных в культуре клеток Vero, позволяющие получать активную вирусосодержащую суспензию.

Заключение

В результате проведенных исследований определены оптимальные системы культивирования вируса чумы плотоядных на культурах клеток и установлены основные параметры, позволяющие получать вирусосодержащую суспензию вируса, пригодную в технологии изготовления специфических антигенов. Полученные нами результаты совпадают с литературными данными и дополняет информацию об оптимальных условиях культивирования вируса чумы плотоядных.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» по целевому финансированию на 2022 год при поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан.

Литература:

1 Бакулин В.А., Каштанова Д.В. Чума плотоядных // Ветеринарная клиника. - 2014. - №10. - С. 15 - 17.

2 Baumgartner W., Alldinger S., Beineke A., Groters S., et al. Canine distemper virus an agent looking for new hosts. German. – 2003. – Vol. 110. – P. 137-42. PMID: 12756952.

3 Воробьева А. А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: Медицинское информационное агентство. – 2003. – 236 с.

4 Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. J Virol. – 2013. – Vol. 87. – P. 1105-1114. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02419-12>. . Epub 2012 Nov 7. PMID: 23135729.

5 Qiu W, Zheng Y, Zhang S, Fan Q, Liu H, Zhang F, Wang W, Liao G, Hu R. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 17. – P. 1541-1543. doi: 10.3201/eid1708.101153. PMID: 21801646; PMCID: PMC3381540.

6 Cleaveland S., Appel M.G., Chalmers W.S., Chillingworth C., Kaare M., Dye C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. Vet. Microbiol. - 2000. — P. 217–227.

7 Reed I.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Hygiene*. – 1938. – 27. – P.493 – 497.

8 ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности.

9 Gilbert M., Soutyrina S.V., Seryodkin I.V., Sulikhan N., Uphyrkina O.V., Goncharuk M., Matthews L., Cleaveland S., Miquelle D.G. Canine distemper virus as a threat to wild tigers in Russia and across their range. Integr Zool. - 2015. – Vol. 10. – P. 329-343. doi: 10.1111/1749-4877.12137. PMID: 25939829.

10 Кошеметов Ж.К., Кыдырбаев Ж.К., Султанкулова К.Т. и др. Чума плотоядных угрожает редким животным. // *Инновационное развитие науки в обеспечении биологической безопасности*. - 2014. – С.131-135.

11 Орынбаев М. Б., Белоусов В. Ю., Султанкулова К. Т., Строчков В. М., Керимбаев А. А. Секвенирование и филогенетический анализ р- и h-генов штаммов вируса чумы плотоядных, выделенных на территории Казахстана. // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. - 2011. - № 3 (11). - С. 11-17.

12 Бронникова Т.М. Характеристика вируса чумы плотоядных. IX Межд. Студенческая научная конференция. Сочи – 2017.

13 Сюрин В.Н. Частная ветеринарная вирусология: учеб. Пособие / В.Н. Сюрин, Н. В. Фомина – М.: Колос. - 1979. – 472 с.

14 Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. BMC Vet Res. - 2016. P. 120-126. doi: 10.1186/s12917-016-0702-z.

А.Р. ӘБДІМҰХТАР*, Г.Д. НАХАНОВА, Ж.К. КОШЕМЕТОВ, Б.К. УМИРАЛИЕВ,
Н.К. ОРАЗЫМБЕТОВА, Ш.С. ТҰРЫСКЕЛДІ, С.Ш. НУРАБАЕВ

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты, Гвардейск күк,
Қазақстан

* e-mail: azamat_95.96@mail.ru

ЕТ ҚОРЕКТІЛЕР ОБАСЫ ВИРУСЫН ӨСІРУДІҢ ОҢТАЙЛЫ ЖҮЙЕСІН ТАҢДАУ

Түйін

Ет қоректілер обасы вирусы – қызба, пневмония, шырышты қабықтың қабынуы, лейкопения және орталық жүйке жүйесінің зақымдануымен сипатталатын өте жұқпалы патоген. Бұл аурудың соңы көбінесе өліммен аяқталады. Бұл ауруға барлық иттердің түрлері, күзен, арктикалық түлкі, қасқыр, түлкі, итбалық, жолбарыс және т.б. етқоректілердің барлығы бейім болып келеді. Соңғы жылдары приматтарда, оның ішінде асыл тұқымды және жабайы резус маймылдары мен яван макакаларында ет қоректілер обасы түр аралық инфекция түрінде байқалды. Резус

маймылдарындағы өлім көрсеткіші 5-30% жетті. Бұл вируспен күресудің ғасырға жуық тарихына қарамастан, диагностика, алдын алу және нақты емдеу мәселелері өзекті болып қала береді. Бұл мәселенің маңыздылығын ескере отырып, диагностикалық немесе профилактикалық препараттарды жасау үшін жоғары белсенді вирустық биомассаны жасау қажеттілігі жоғары болып табылады. Осыған байланысты, біздің зерттеулеріміз ет қоректілер обасы вирусының жасуша өсіндісінде өсу ерекшеліктерін анықтауға және оңтайлы өсіру жүйесін таңдауға арналды. Зерттеу нәтижесінде Vero жасуша өсіндісі ет қоректілер обасы вирусын өсіру үшін ең оңтайлы деп танылды. Вирустың ЦПӨ 48-56 сағатта дамиды, вирус титрі $6,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ құрады. Сонымен қатар Vero жасуша өсіндісінде ет қоректілер обасы вирусын өсірудің негізгі параметрлері анықталды.

Кілтті сөздер: ет қоректілер обасы, жасуша өсіндісі, вирусты өсіру, вирустың бейімделуі.

IRSTI: 34.25.29

A.R. ABDIMUKHTAR*, G.D. NAHANOVA, Zh.K. KOSHEMETOV,
B.K. UMIRALIYEV, N.K. ORAZYMBETOVA, Sh.S. TURYSKELDI,
S.Sh. NURABAEV

Scientific Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy uts, Kazakhstan

* e-mail: azamat_95.96@mail.ru

SELECTION OF THE OPTIMAL SYSTEM OF CULTIVATION OF CARNIVOROUS DISPEST VIRUS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.06

Abstract

Canine distemper virus is a highly contagious pathogen characterized by fever, pneumonia, mucosal inflammation, leukopenia, and central nervous system involvement. This often leads to the death of carnivores. All dogs, regardless of breed, are susceptible to this disease, minks, arctic foxes, wolves, foxes, seals, tigers, etc. In recent years, interspecific infections of canine distemper have been observed in non-human primates, including bred and wild rhesus monkeys and cynomolgus monkeys. Mortality from canine distemper in rhesus monkeys reaches 5–30%. Despite almost a century of history of the fight against this infection, the issues of diagnosis, prevention and specific treatment remain relevant. Considering the importance of this problem, it is necessary to develop a highly active viral biomass in order to develop diagnostic or prophylactic agents. In this regard, our studies were devoted to studying the cultural properties and determining the optimal conditions for the cultivation of canine distemper virus.

As a result of research, we have recognized the Vero cell culture as the most optimal for the propagation of canine distemper virus. Cytopathic effect of the virus develops in 48-56 hours, the virus titer was $6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The main parameters of canine distemper virus cultivation in Vero cell culture were also determined.

Keywords: canine distemper, cell culture, cultivation, virus adaptation.

Plague of carnivores is a highly contagious, ubiquitous disease accompanied by high fever, inflammation of the mucous membranes of the respiratory and visual organs, and damage to the central nervous system [1]. The plague has been known since the domestication of dogs. The causative agent of carnivorous plague is an RNA-containing virus that has two proteins on its surface-antigens H and F. The carnivorous plague virus is a member of the *Paramyxoviridae* family, the genus *Morbillivirus*. The human measles virus, cattle plague and pathogens of a number of other diseases belong to the same group [2, 3].

It is important to note that recently there have been outbreaks of carnivorous plague with high mortality among non-human primates. A major outbreak of carnivorous plague occurred in rhesus monkeys on a breeding farm in Guangxi Province in 2006, followed by another outbreak in rhesus monkeys at the animal Center in Beijing in 2008. Mortality from carnivorous plague in

rhesus monkeys reaches 5-30%. In this regard, there is a possibility of transmission of the virus from animals to humans in the future [4, 5].

Carnivorous plague can occur at lightning speed, hyperacute, acute, subacute, abortive, typical and atypical. According to clinical signs, there are catarrhal, pulmonary, intestinal, cutaneous, nervous and mixed (generalized) forms of the disease. The development of a particular form of plague is determined by the reactivity of the animal's body. The same strain of the pathogen can cause different types of clinical signs in animals [6].

Despite the almost century-old history of the fight against this infection, the issues of diagnosis, prevention and specific treatment remain relevant. To develop diagnostic and preventive means, it is necessary to develop a highly active viral biomass. Modern requirements for the effectiveness and safety of veterinary drugs, as well as their high-quality production in compliance with GMP rules, lead to the improvement of technologies for the manufacture of vaccine preparations, the production of which is reduced to the cultivation of vaccine strains of various viruses in a transferable cell line. Determination of optimal conditions for virus cultivation is the most important characteristic of a virus-containing suspension suitable for the manufacture of specific prophylaxis. Obtaining a virus with the greatest biological and antigenic activity allows the development of antiviral drugs with high immunogenic activity. Based on this, the purpose of this study is to select the optimal system for cultivating the carnivorous plague virus.

Materials and methods

Virus strains. The strains "LD" and "Vacchum" of the carnivorous plague virus were used in the work.

Choosing the optimal system for cultivating the carnivorous plague virus. According to numerous researchers, both primary and transferable cell cultures are used for the cultivation of the carnivorous plague virus [9, 10].

Adaptation of the carnivorous plague virus to cell culture was carried out using the following cell lines: primary-trypsinized – lamb kidney and calf kidney, as well as transplanted cell culture lines – Vero, BHK-21, kidney of a pig embryo, IB-RS-2 and sheep kidney grown in test tubes. To adapt the strain "LD" and "Vacchum" of the carnivorous plague virus to the cell line, 6 consecutive passages of the virus were carried out on the above cultures.

To study the effect of the quality of the supporting nutrient medium on the reproduction of the carnivorous plague virus, we tested the SSW, DMEM and Igla nutrient media available in the RIBSP. In order to determine the effect of serum concentration on the reproduction of the carnivorous plague virus in cell cultures, we tested 1, 2, 5 and 10% concentrations of fetal serum of calves in a supportive environment.

Determination of the biological activity of a strain of carnivorous plague virus in tested cultivation systems. To determine the optimal infecting dose of the carnivorous plague virus at which its greatest accumulation occurs, we tested doses of the virus from 0.01 to 1 TCID₅₀/cl. Upon achieving cytopathic effect in the monolayer of cell culture by 85-90%, mattresses were subjected to two cycles of freezing-thawing in the range from minus 40°C to room temperature. The collection of virus-containing materials (VCM) of each passage was carried out under aseptic conditions in sterile vials. At the same time, samples were taken from each vial with VSM to determine the biological activity of the virus in accordance with the method. The virus titer was calculated using the Reed I.J. and Muench H. A method were specified in lg TCID₅₀/cm³ [7]. The sterility of the VCM of each passage was determined according to Interstate Standard 28085-2013 [8].

Statistical processing of the results. All experiments were carried out in three-fold repetition. Statistical processing of experimental data was carried out with the calculation of the arithmetic mean (M) and the mean square error (m) using the computer program "Microsoft Excel" and GraphPad Prism version 8.0.1. Digital data were subjected to statistical analysis with the determination of averages and their errors by the direct and difference method according to the Student.

Results and discussion

Choosing the optimal system for cultivating the carnivorous plague virus

Using the above cell cultures, 6 consecutive passages were carried out. The results of these studies are presented in table 1.

Table 1 - Virus adaptation to different cell cultures

Name of the cell culture	Virus/strain	Passage level					
		1	2	3	4	5	6
lamb kidney	"LD"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
calf kidney	"LD"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++
Vero	"LD"	+ ---	+ ++-	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
BHK-21	"LD"	- ---	+ ---	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++	+ +++
kidney of a pig embryo	"LD"	- ---	-- --	-- ++	- +++	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	- ---	+ --	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++
IB-RS-2	"LD"	- ---	-- --	+ ---	+ ++-	+ +++	+ +++
	"Vakchum"	- ---	-- --	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++
sheep kidney	"LD"	- ---	-- --	+ ---	+ +--	+ ++-	+ +++
	"Vakchum"	- ---	+ ---	+ +--	+ +++	+ +++	+ +++
Notes:							
1 «+ - -» – the appearance of cytopathic action by 25%;							
2 «+ + -» the appearance of cytopathic action by 50%;							
3 «+ + + -» – the appearance of cytopathic action by 75%;							
4 «+ + + +» – the appearance of cytopathic action by 100%;							
5 «- - -» – absence of cytopathic action.							

As can be seen from the results of Table 1, the carnivorous plague virus adapts to cell cultures of lamb kidney, calf kidney, Vero, BHK-21 and kidney of a pig embryo at the 3rd passage level. The adaptation was longer, at the 4th passage level, to cell cultures of the IB-RS-2 and sheep kidney transplanted line.

In the cultures of the cells of lamb kidney, calf kidney, Vero and BHK-21 the cytopathic action of the virus developed 48-56 hours after infection, the destruction of the monolayer and its detachment from the glass was observed after 72 hours. In cell cultures, the kidney of a pig embryo, IB-RS-2 cytopathic action of the virus developed after 72 hours. Reproduction of the virus was accompanied at first by focal, and later, after 96 hours, almost complete destruction of the cellular monolayer.

Thus, the conducted studies have shown that all tested cell cultures are sensitive to the carnivorous plague virus. It should be noted that a more pronounced and earlier cytopathic action of the carnivorous plague virus is observed in the cell cultures of lamb kidney and Vero. It was also noted that calf kidney and kidney of a pig embryo cell cultures have satisfactory characteristics.

Development of optimal parameters for obtaining active virus-containing material in selected cultivation systems

The results of determining the biological activity of the virus strain in the tested cultivation systems are presented in Table 2.

Table 2 – Biological activity of the carnivorous plague virus in various cell cultures

Name of the cell culture	Number of experiments	Biological activity of viruses in cell culture, lg TCID ₅₀ /cm ³ (M±m)	
		"LD"	"Vakchum"
lamb kidney	3	5,75±0,11	5,31±0,08
calf kidney	3	5,00±0,14	4,73±0,12
Vero	3	6,25±0,11	5,75±0,12
BHK-21	3	5,0±0,07	4,77±0,11
kidney of a pig embryo	3	4,5±0,10	4,43±0,09
sheep kidney	3	4,03±0,09	3,77±0,11

From the data presented in Table 2, it follows that the most acceptable cell culture for determining biological activity is the cell cultures of lamb kidney and Vero. At the same time, the biological activity of the virus is 5.75–6.25 lg TCID₅₀/cm³, respectively.

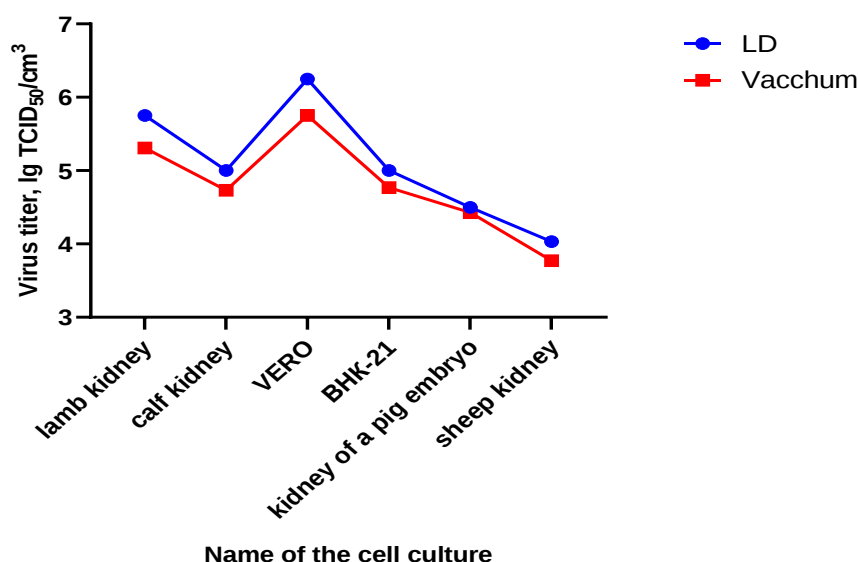


Figure 1 - Biological activity of the carnivorous plague virus in various cell cultures

To determine the optimal infecting dose of the carnivorous plague virus at which its greatest accumulation occurs, we tested doses of the virus from 0.01 to 1 TCID₅₀/cl., which infected the Vero cell culture. The collection of viral raw materials was carried out 72-96 hours after infection.

The biological activity of the viral material was determined by titration of samples in Vero cell culture.

As a result of these studies, it was found that the greatest accumulation of the carnivorous plague virus in cell culture ($6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$) occurs at an infecting dose of $0.1-0.5 \text{TCID}_{50}/\text{cl.}$, and the optimal time for collecting viral material is 96 hours.

To study the effect of the quality of the supporting nutrient medium on the reproduction of the carnivorous plague virus, we tested the SSW, DMEM and Igla nutrient media available in the RIBSP. As a result of the conducted studies, it was found that the nutrient medium of Igla and SSW decreased its pH after 48-72 hours and caused a sharp slowdown in the reproduction of the virus and the necrosis of the monolayer of cells. The DMEM medium did not affect the cell monolayer for 8-10 days and contributed to the reproduction of the carnivorous plague virus in the tested cell cultures after 72-96 hours. The cytopathic effect of the virus on the Vero cell culture is shown in Figure 2.

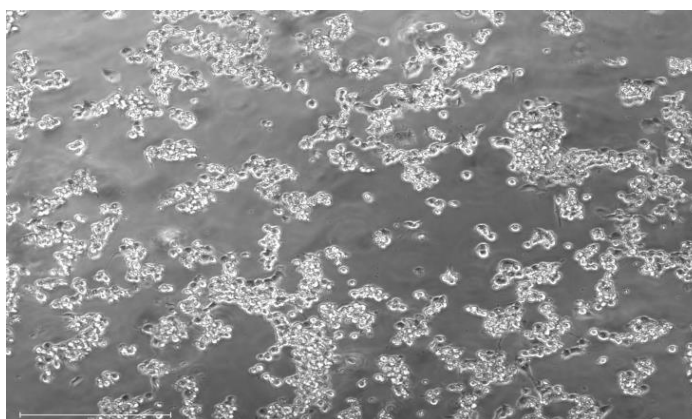


Figure 2 – cytopathic effect of carnivorous plague virus in vero cell culture (magnification x 100).

In order to determine the effect of serum concentration on the reproduction of the carnivorous plague virus in cell cultures, we tested 1, 2, 5 and 10% concentrations of fetal serum of calves in a supportive environment. As a result of the conducted studies, it was found that the 1% serum content did not contribute to the rapid accumulation of the virus, the cytopathic effect of the virus was weak, the destruction of the monolayer did not occur. In further studies, it was determined that the optimal serum concentration was 2%.

Viral diseases of carnivores cause significant damage to fur farming, domestic and service dog breeding. The most dangerous of them is the plague of carnivores. The first outbreaks of these diseases appeared in Asia 3,000 years ago, and then spread to the Middle East, and then to Europe. In Russia, the plague of dogs was first registered in 1762 in the Crimea and called it the "Crimean disease", then in 1770 it was discovered in Moscow [9]. On the territory of the Republic of Kazakhstan, the plague of carnivores is found everywhere. An analysis of the literature shows that this disease has been registered in the country in different years among dogs of various breeds, minks, thorzofredok, arctic foxes, foxes and seals. [10, 11].

The carnivorous plague virus can be adapted to chicken embryos and cultured in them when infected with the chorionallantoid shell. Grayish foci and strands appear in the shell, as a result, the embryos die. Infection of embryos by introducing virus-containing material into the yolk sac leads to their death on the 7th-11th day after infection [12]. From the literature data, we know that the carnivorous plague virus actively reproduces in primary cultures of kidney and lung cells of dogs, ferrets, and the mucous membrane of the bladder of dogs, and adapted strains - in chicken embryo cells and in transplanted cells - MDVK, Vero, etc. [13]. The cytopathic effect of the virus is manifested by the formation of syncytium 7-14 days after infection of the monolayer [14]. After adaptation, the virus can be cultivated on 3-6-month-old ferrets and 6-12-month-old dog puppies.

According to the results of our studies, the carnivorous plague virus is adapted to cell cultures of lamb kidney, calf kidney, Vero, BHK-21, kidney of a pig embryo IB-RS-2 starting from the 3rd passage level, causes cytopathic effect in 48-72 hours. We have recognized the Vero cell culture as the most optimal system for reproduction of the carnivorous plague virus. The cytopathic effect of the virus develops after 48-56 hours, the titer of the virus was $6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The main parameters (infecting dose, serum concentration, nutrient medium) of cultivation of the carnivorous plague virus in Vero cell culture allowing to obtain an active virus-containing suspension have been determined.

In order to determine the effect of serum concentration on the reproduction of the carnivorous plague virus in cell cultures, we tested 1, 2, 5 and 10% concentrations of fetal serum of calves in a supportive environment. As a result of the conducted studies, it was found that the 1% serum content did not contribute to the rapid accumulation of the virus, the cytopathic effect of the virus was weak, the destruction of the monolayer did not occur. In further studies, it was determined that the optimal serum concentration was 2%.

Viral diseases of carnivores cause significant damage to fur farming, domestic and service dog breeding. The most dangerous of them is the plague of carnivores. The first outbreaks of these diseases appeared in Asia 3,000 years ago, and then spread to the Middle East, and then to Europe. In Russia, the plague of dogs was first registered in 1762 in the Crimea and called it the "Crimean disease", then in 1770 it was discovered in Moscow [9]. On the territory of the Republic of Kazakhstan, the plague of carnivores is found everywhere. An analysis of the literature shows that this disease has been registered in the country in different years among dogs of various breeds, minks, thorsofredok, arctic foxes, foxes and seals. [10, 11].

The carnivorous plague virus can be adapted to chicken embryos and cultured in them when infected with the chorionallantoid shell. Grayish foci and strands appear in the shell, as a result, the embryos die. Infection of embryos by introducing virus-containing material into the yolk sac leads to their death on the 7th-11th day after infection [12]. From the literature data, we know that the carnivorous plague virus actively reproduces in primary cultures of kidney and lung cells of dogs, ferrets, and the mucous membrane of the bladder of dogs, and adapted strains - in chicken embryo cells and in transplanted cells - MDVK, Vero, etc. [13]. The cytopathic effect of the virus is manifested by the formation of syncytium 7-14 days after infection of the monolayer [14]. After adaptation, the virus can be cultivated on 3-6-month-old ferrets and 6-12-month-old dog puppies.

According to the results of our studies, the carnivorous plague virus is adapted to cell cultures of lamb kidney, calf kidney, Vero, BHK-21, kidney of a pig embryo IB-RS-2 starting from the 3rd passage level, causes cytopathic effect in 48-72 hours. We have recognized the Vero cell culture as the most optimal system for reproduction of the carnivorous plague virus. The cytopathic effect of the virus develops after 48-56 hours, the titer of the virus was $6.25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. The main parameters (infecting dose, serum concentration, nutrient medium) of cultivation of the carnivorous plague virus in Vero cell culture allowing to obtain an active virus-containing suspension have been determined.

Conclusion

As a result of the conducted studies, optimal systems for cultivating the carnivorous plague virus on cell cultures were determined and the main parameters were determined that allow obtaining a virus-containing suspension of the virus suitable for the production of specific antigens. The results obtained by us coincide with the literature data and complements the information about the optimal conditions for the cultivation of the carnivorous plague virus.

Funding

The work was carried out within the framework of the state task "Biological safety services in the field of science" for targeted funding for 2022 with the support of the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Bakulin V.A., Kashtanova D.V. (2014) Chuma plotoyadnyh [Canine distemper]. Veterinarnaya klinika. - no 10. - pp. 15 - 17.
- 2 Baumgartner W., Alldinger S., Beineke A., Groters S., et all. Canine distemper virus an agent looking for new hosts. German. – 2003. – Vol. 110. – P. 137-42. PMID: 12756952.
- 3 Vorob'eva A. A. (2003) Atlas po medicinskoj mikrobiologii, virusologii i immunologii [Atlas of Medical Microbiology, Virology and Immunology]. M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo. – 236 p.
- 4 Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. J Virol. – 2013. – Vol. 87. – P. 1105-1114. doi: 10.1128/JVI.02419-12. Epub 2012 Nov 7. PMID: 23135729.
- 5 Qiu W, Zheng Y, Zhang S, Fan Q, Liu H, Zhang F, Wang W, Liao G, Hu R. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 17. – P. 1541-1543. doi: 10.3201/eid1708.101153. PMID: 21801646; PMCID: PMC3381540.
- 6 Cleaveland S., Appel M.G., Chalmers W.S., Chillingworth C., Kaare M., Dye C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. Vet. Microbiol. - 2000. — P. 217–227.
- 7 Reed I.J., Muench H.A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *American Journal of Hygiene.* – 1938. – 27. – P.493 – 497.
- 8 GOST 28085-2013 Sredstva lekarstvennye biologicheskie dlya veterinarnogo primeneniya. Metody kontrolya steril'nosti.
- 9 Gilbert M., Soutyrina S.V., Seryodkin I.V., Sulikhan N., Uphyrkina O.V., Goncharuk M., Matthews L., Cleaveland S., Miquelle D.G. Canine distemper virus as a threat to wild tigers in Russia and across their range. Integr Zool. - 2015. – Vol. 10. – P. 329-343. doi: 10.1111/1749-4877.12137. PMID: 25939829.
- 10 Koshemetov ZH.K., Kydyrbaev ZH.K., Sultankulova K.T.(2014) Chuma plotoyadnyh ugrazhaet redkim zivotnym [The plague of carnivores threatens rare animals]. Innovacionnoe razvitie nauki v obespechenii biologicheskoy bezopasnosti. – pp.131-135.
- 11 Orynbaev M. B., Belousov V. YU., Sultankulova K. T., Strochkov V. M., Kerimbaev A. A. (2011) Sekvenirovanie i filogeneticheskij analiz p- i h-genov shtammov virusa chumy plotoyadnyh, vydelennyh na territorii Kazakhstana [Sequencing and phylogenetic analysis of p- and h-genes of canine distemper virus strains isolated in Kazakhstan]. Aktual'nye voprosy veterinarnoj biologii, vol 3, no 11, pp. 11-17.
- 12 Bronnikova T. M. (2017) Harakteristika virusa chumy plotoyadnyh [Characterization of canine distemper virus]. IX Mezhd. Studencheskaya nauchnaya konferenciya. Sochi.
- 13 Syurin V.N. (1979) Chastnaya veterinarnaya virusologiya: ucheb. Posobie [Private veterinary virology].– M.: Kolos, 472 p.
- 14 Martinez-Gutierrez M, Ruiz-Saenz J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. BMC Vet Res. - 2016. P. 120-126. doi: 10.1186/s12917-016-0702-z.

МРНТИ: 68.03.07, 34.27.23, 34.27.51

Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, М.Г. САУБЕНОВА¹, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹,
А.В. КЕРДЯШКИН², М.Е. ЕЛУБАЕВА¹, Г.В. КЕРДЯШКИНА¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

² Институт ботаники и фитоинтродукции, Алматы, Казахстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ ПШЕНИЦЫ К ЗАСОЛЕНИЮ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.07

Аннотация

Засоление почв является серьезной проблемой Республики Казахстан. Один из путей повышения толерантности сельскохозяйственных культур к солевому стрессу – использование сообществ эндофитных микроорганизмов, повышающих устойчивость растений к различным повреждающим воздействиям. В данной работе показано влияние эндофитов растений, произрастающих в засушливых условиях, на способность проростков пшеницы противостоять солевому стрессу. Наилучшие результаты на синтетической среде показала ассоциация из растения *Erigeron canadensis* в сочетании с эндофитным актиномицетом пшеницы, отнесенным к виду *Streptomyces curacoii*. Влияние предварительной адаптации эндофитных микроорганизмов к хлориду натрия на устойчивость растения-хозяина к засолению было показано нами впервые.

Ключевые слова: эндофиты, пшеница, солеустойчивость, адаптация, актиномицеты.

На территории Казахстана 41% почв относится к засоленным. Особенно широко они распространены в южных и центральных районах [1]. Повсеместно отмечаемые изменения климатических условий в сочетании с нерациональной деятельностью человека наносят серьезный урон растениеводству, снижая урожайность и качество производимой продукции. По приблизительному расчету ФАО около 96,5% сельскохозяйственных земель в мире подвержены абиотическим стрессам [2]. Наиболее серьезный абиотический стресс во всем мире, влияющий на рост и продуктивность растений за счет воздействия на несколько физиологических и метаболических процессов, связан с засухой и засолением. Повышение концентрации соли в том и другом случае является причиной осмотического стресса растений и роста ионной токсичности, при которых снижается скорость прорастания семян, ингибируется фотосинтез растений, теряется целостность клеточных мембран и повышается образование активных форм кислорода [3-5]. Избыточное поглощение и накопление ионов натрия и хлора в тканях растений приводит к серьезному ионному дисбалансу и функциональным нарушениям, а именно препятствует поглощению элементов, необходимых для роста и развития, таких как ионы калия, что приводит к снижению продуктивности и возможной гибели растений [6].

Ранее применяемые селекционные и трансгенные технологии повышения резистентности культурных растений, в особенности в отношении солеустойчивости, пока не увенчались окончательным успехом [7, 8]. Многочисленными исследованиями показано, что толерантность растений к солевому стрессу можно повысить с помощью экзогенных биостимуляторов, таких как ризобактерии, способствующих росту растений (PGPR) [9-12]. Они применимы к широкому кругу сельскохозяйственных культур для улучшения прорастания семян при одновременном увеличении биомассы и продуктивности растений [13-15]. Большинство PGPR включают различные штаммы видов *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Rhizobium* [16, 17]. Однако защитные свойства PGPR не безграничны и с увеличением засоления теряют свойства стимуляции роста растений [18].

В комплексной борьбе с повреждающим воздействием таких абиотических факторов как засуха, засоление, а также низкая или высокая температура, стресс, связанный с тяжелыми металлами, наряду с традиционными способами использования более устойчивых сортов культурных растений все большее значение приобретает применение эндوفитов – сообществ микроорганизмов, колонизирующих растения и повышающих их способность противостоять различным повреждающим воздействиям [19-25]. Показано, что эндوفитные актиномицеты могут выполнять функции стимулирующих рост растений микроорганизмов за счет разнообразных механизмов воздействия [26-28].

Непосредственное влияние эндوفитных микроорганизмов на солеустойчивость растений еще крайне слабо исследовано. Однако, имеются данные о облегчении солевого стресса у растений томата с помощью галотолерантного актиномицета [29]. Qin и соавторами [30] показано, что эндوفитные актиномицеты вносят вклад в устойчивость галофитного растения *Limonium sinense*. Выявлено также, что колонизация пшеницы эндوفитными актиномицетами происходит на самых ранних стадиях развития [31], что может быть полезным при предпосевной обработке семян.

В данной работе выделены эндوفитные актиномицеты пшеницы и исследовано влияние эндوفитных микроорганизмов, выделенных из различных растений в условиях засухи, на способность проростков пшеницы противостоять солевому стрессу. Исходя из предыдущего опыта работы в области повышения устойчивости микроорганизмов путем адаптации к солевому стрессу [32], сделано также предположение о возможности влияния предварительной адаптации эндوفитных микроорганизмов к солевому стрессу на солеустойчивость растений-хозяев.

Объекты и методы исследования

В работе использовали ранее выделенные ассоциации ОЖ-Ра и ОЖП эндوفитных микроорганизмов из засухоустойчивых растений мелколепестник канадский *Erigeron canadensis* и горец птичий *Polygonum aviculare*, обитающих в пределах г. Алматы и показавших ранее положительное влияние на рост пшеницы в лабораторных условиях засухи [33].

Эндوفитные микроорганизмы выделяли из растений пшеницы (*Triticum aestivum*) после 30-дневного культивирования в лабораторных условиях атмосферной засухи (начиная с 10 дня от засева) на почве, отобранной за пределами г. Алматы вблизи полей с посевами злаковых культур. Для выделения эндوفитов корни и стебли растений тщательно отмывали, ополаскивали стерильной водопроводной водой, разрезали на кусочки размером около 1 см, обрабатывали последовательно 70% этанолом, гипохлоритом натрия и снова 70% этанолом, затем трехкратно отмывали в стерильной водопроводной воде. Далее кусочки стебля и корня отдельно растирали в ступке, добавляли 1 мл стерильной воды и высевали на смесь сред (1:1): мясо-пептонный агар (Nutrient agar, TM-Media, India) и Сабуро (г/л: глюкоза 40,0; пептон 10,0; агар-агар 20,0). Для контроля часть цельных обработанных кусочков стебля и корня раскладывали на поверхность среды в чашках Петри, а также производили высеивание воды из последнего промывания. Посевы культивировали при 30°C в течение 48 ч. Изолированные актиномицеты в дальнейшем поддерживали на среде для культивирования актиномицетов (TM Media, Индия).

Для молекулярно-генетической идентификации актиномицетов проводили секвенирование 16S рРНК по Сэнгеру. Для филогенетического дерева использовали последовательности референтных штаммов Международной базы данных Blast NCBI. Построение дерева производили в программе Mega 11 с выравниванием последовательностей по ClustalW.

Для обработки семян пшеницы использовали ассоциации микроорганизмов ОЖ-Ра из *P. aviculare*, ОЖП из *E. canadensis* и изолированные актиномицеты. Составляющие микроорганизмы также дополнительно адаптировали к хлориду натрия путем последовательных пересевов на оптимальную среду с добавлением 2% NaCl. Влияние

каждой ассоциации исследовали с использованием неадаптированных и адаптированных микроорганизмов.

Для получения ассоциаций использовали равные соотношения составляющих микроорганизмов. Семена пшеницы сортировали и отбирали семена одного размера. На один вариант опыта использовали 2 чашки Петри по 15 семян. Семена равномерно смачивали 1 мл суспензии клеток (10^7 КОЕ/мл по стандарту мутности Мак-Фарланда) в стерильной водопроводной воде и раскладывали на поверхности подготовленной среды Ковровцева с добавлением хлорида натрия (г/л: NaCl 10,0; MgSO₄ 1,0; K₂HPO₄ 1,0; CaHPO₄ 0,2; агар-агар 6,0; вода водопроводная). В контроле использовали 1 мл стерильной водопроводной воды. Культивировали при 30 °С. Через 3 суток после посева учитывали количество проросших семян и количество корешков. Через 7 суток измеряли длину стебля и максимальную длину корня.

Статистическую обработку данных проводили в программе Excel с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и апостериорных тестов. Для сравнения средних значений по отношению к контролю использовали критерий Даннетта [34, 35], для попарных сравнений между обработкой адаптированными и неадаптированными вариантами различных ассоциаций использовали тест Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Из корней пшеницы, культивировавшейся в условиях атмосферной засухи выделено несколько изолятов актиномицетов, продуцирующих бурый пигмент в среду. Среди них отобрано два изолята, наиболее различающихся по степени продукции пигмента в среду: Wh и 1zh2. Проведена молекулярно-генетическая идентификация отобранных штаммов. Филогенетическое древо эндофитных актиномицетов пшеницы приведено на рисунке 1.

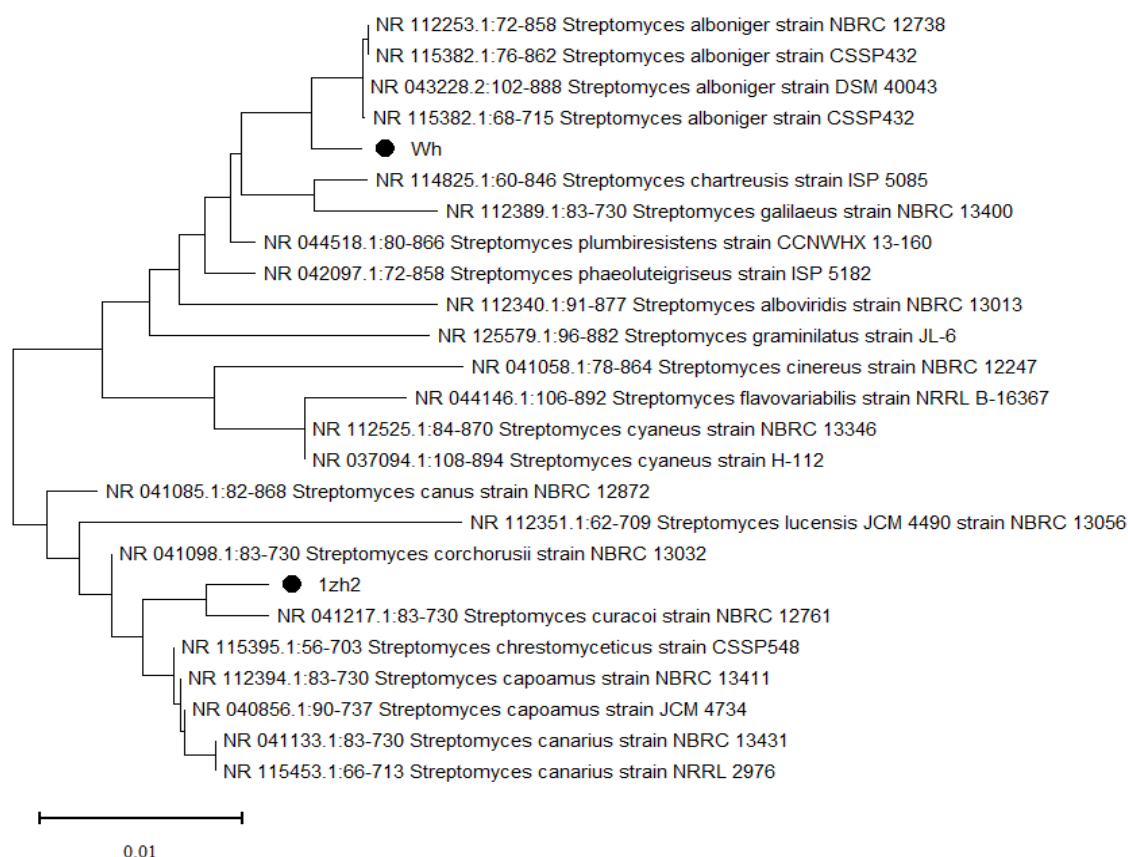


Рисунок 1 – Филогенетическое древо эндофитных актиномицетов пшеницы, культивировавшейся в засушливых условиях

Степень гомологии последовательности нуклеотидов изолята 1zh2 с ближайшим штаммом NR 041217.1:83-730 *Streptomyces curacoii* strain NBRC 12761 составила 99,38%, а изолята Wh с ближайшим штаммом NR 043228.2:102-888 *Streptomyces alboniger* strain DSM 40043–99,37%. На основании полученных результатов, эндофитные актиномицеты идентифицированы как *S. curacoii* 1zh2 и *S. alboniger* Wh.

Выделенные актиномицеты были использованы совместно с ассоциациями эндофитных микроорганизмов *E. canadensis* и *P. aviculare* для предпосевной обработки семян пшеницы при культивировании на среде с повышенным содержанием хлорида натрия. Таблицы 1 и 2 показывают данные по влиянию предпосевной обработки семян пшеницы ассоциациями микроорганизмов, в том числе адаптированными к повышенной концентрации хлорида натрия.

Таблица 1 – Показатели прорастания семян пшеницы (через 3 суток) на среде Ковровцева с добавлением 1% хлорида натрия

Ассоциация	Вариант	Количество семян с проростком стебля, %	Среднее количество корней, шт.
Контроль	Без обработки	53	0,9±0,2
ОЖ-Ра	Неадаптированные	87	1,5±0,2
	Адаптированные к NaCl	87	1,8±0,2*
ОЖП	Неадаптированные	97	2,3±0,2**
	Адаптированные к NaCl	93	2,0±0,4*
ОЖП + <i>S. alboniger</i> Wh	Неадаптированные	93	2,1±0,2**
	Адаптированные к NaCl	100	2,0±0,2**
ОЖП + <i>S. curacoii</i> 1zh2	Неадаптированные	83	1,6±0,2
	Адаптированные к NaCl*	94	2,3±0,2**

Примечание – ОЖ-Ра - консорциум эндофитных микроорганизмов из *P. aviculare*; ОЖП - консорциум эндофитных микроорганизмов из *E. canadensis*; * отклонение относительно контроля достоверно при $p < 0,05$; ** при $p < 0,01$; *в графе «Вариант» означает статистически достоверное отличие относительно неадаптированного варианта.

Таблица 2 – Показатели развития проростков пшеницы (через 7 суток) на среде Ковровцева с добавлением 1% хлорида натрия

Ассоциация	Вариант	Количество растений в % относительно засева	Средняя длина корня, мм	Средняя длина стебля, мм
Контроль	Без обработки	37	-	3,9±0,4
ОЖ-Ра	Неадаптированные	27	2,6±0,2	3,6±0,4
	Адаптированные к NaCl	27	2,2±0,2	3,3±0,6
ОЖП	Неадаптированные	50	4,8*±0,2	5,6*±0,5
	Адаптированные к NaCl	40	3,9±0,3	5,5±0,7
ОЖП + <i>S. alboniger</i> Wh	Неадаптированные	37	3,6±0,3	4,4±0,4
	Адаптированные к NaCl	23	3,1±0,3	3,1±0,6
ОЖП + <i>S. curacoii</i> 1zh2	Неадаптированные	50	3,6±0,3	3,4±0,5
	Адаптированные к NaCl	60	4,4*±0,2	6,2*±0,2

Примечание – ОЖ-Ра - консорциум эндофитных микроорганизмов из *P. aviculare*; ОЖП - консорциум эндофитных микроорганизмов из *E. canadensis*; “-” невозможно измерить из-за распространения грибковой инфекции; * отклонение относительно неадаптированного варианта достоверно при $p < 0,05$.

Приведенные в таблице 1 данные показывают, что обработанные эндофитными микроорганизмами семена быстрее прорастают на среде с добавлением 1% хлорида натрия

в сравнении с необработанным контролем. Уже через 3 суток после засева отмечается различие в количестве проросших семян и длине корешков пшеницы.

Через 7 суток (таблица 2) выживаемость в контроле составила 37% по отношению к количеству засеянных семян, а в варианте с обработкой адаптированными к хлориду натрия микроорганизмами ассоциации из *E. canadensis*, включающей *S. curacoï* 1zh2, - 60%. Значительное влияние на полученные результаты оказало распространение грибковых заболеваний пшеницы (рисунок 2). Отсутствие грибкового поражения в варианте с обработкой эндофитными микроорганизмами позволяет предположить также наличие у них противогрибковой активности. Однако для подтверждения этого предположения необходимо отдельное исследование.



Рисунок 2 – Влияние эндофитных микроорганизмов и их адаптации к хлориду натрия на солеустойчивость проростков пшеницы

Наилучшие результаты по способности проростков пшеницы противостоять солевому стрессу были отмечены в варианте с ассоциацией ОЖП микроорганизмов из *E. canadensis*, и актиномицетом *S. curacoï* 1zh2. Ассоциация ОЖП показала хорошие результаты по длине корней и проростков также при отсутствии в составе *S. curacoï* 1zh2 и использовании неадаптированных вариантов. Предварительное культивирование на среде с 1% NaCl, напротив, несколько снизило выживаемость и не показало статистически достоверных отличий в сравнении с контролем. Указанное отличие может объясняться тем, что основной вклад в защиту растений от солевого стресса в данной ассоциации вносит именно культура актиномицета. Этот вывод подтверждается отсутствием положительного эффекта при использовании *S. alboniger* Wh. Ассоциация ОЖ-Ра из *P. aviculare* также не оказывала защитного действия при солевом стрессе.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности ассоциаций эндофитных микроорганизмов смягчать воздействие солевого стресса на растения пшеницы.

Проведенное исследование также расширяет сведения об эндофитной микробиоте пшеницы и влиянии эндофитных микроорганизмов на устойчивость к солевому стрессу. В литературе имеются сведения о доминировании в корнях риса эндофитных актинобактерий, относящихся к виду *S. alboniger* [36], а также о выделении из различных частей растений пшеницы разнообразных актинобактерий, способных к стимуляции роста и защите от фитопатогенных грибов [37-39]. Yandigeri и соавторами было показано, что эндофитные актинобактерии могут защищать растения пшеницы в условиях водного стресса [40]. Указания о выделении и использовании *S. curacoï* для защиты пшеницы от солевого стресса не найдены в доступной научной литературе.

Влияние предварительной адаптации эндофитных микроорганизмов к хлориду натрия на устойчивость растения-хозяина к засолению было показано нами впервые.

Результаты исследования будут использованы для дальнейшей разработки препарата, способствующего выживанию растений в условиях засоления. Это поможет как избежать отрицательного воздействия вторичного засоления, так и расширить в будущем перечень используемых для растениеводства почв.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке КН МНВО РК (грант № AP09258751).

Литература:

- 1 Исанова Г.Т., Абудувайли Ц., Мамутов Ж.У., Калдыбаев А.А., Сапаров Г.А., Базарбаева Т.А. Засоленные почвы и определение провинции соленакопления на территории Казахстана // Аридные экосистемы. – 2017. – Т. 23, № 4(73). – С. 35–43. <https://cyberleninka.ru/article/n/zasolennye-pochvy-i-opredelenie-provintsii-solenakopleniya-na-territorii-kazahstana>
- 2 Cramer G.R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective // BMC Plant Biol. – 2011. – Vol. 11. – Art.ID 163(2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- 3 Greenberg B.M., Huang X.D., Gerwing P., Yu X.M., Chang P., Wu S.S., Gerhardt K., Nykamp J., Yu X., Glick B., Gerwing P. Phytoremediation of salt impacted soils: greenhouse and the field trials of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth and salt phytoaccumulation // Proceeding of the 33rd AMOP Technical Seminar on Environmental Contamination and Response. - Ottawa: Environment, 2008. – P. 627–637.
- 4 Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu Rev Plant Biol. – 2008. – Vol. 59. – P. 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- 5 Xu Z., Jiang Y., Jia B., Zhou G. Elevated-CO₂ response of stomata and its dependence on environmental factors // Front Plant Sci. – 2016. – Vol. 7. - Art. ID 657. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00657>
- 6 Shah A.N., Tanveer M., Abbas A., Fahad S., Baloch M.S., Ahmad M.I., Saud S., Song Y. Targeting salt stress coping mechanisms for stress tolerance in Brassica: a research perspective // Plant Physiol. Biochem. - 2021. – Vol. 158. – P. 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.044>
- 7 Phang T.H., Shao G.H., Lam H.M. Salt tolerance in soybean // J. Integr. Plant Biol. – 2008. – Vol. 50. – P. 1196–1212. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00760.x>
- 8 Zou P., Li K.C., Liu S., Xing R.G., Qin Y.K., Yu H.H., Zhou M., Li P. Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 126. – P. 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.028>
- 9 Zou P., Lu X., Jing C., Yuan Y., Lu Y., Zhang C., Meng L., Zhao H., Li Y. Low-molecular-weight polysaccharides from *Pyropia yezoensis* enhance tolerance of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) to salt stress // Front. Plant Sci. - 2018. – Vol. 9. – Art. ID 427. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00427>
- 10 Upadhyay S.K., Singh D.P. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment // Plant Biol. (Stuttg). – 2015. – Vol. 17, Issue 1. – P. 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- 11 Li L., Li L., Wang X., Zhu P., Wu H., Qi S. Plant growth-promoting endophyte *Piriformospora indica* alleviates salinity stress in *Medicago truncatula* // Plant Physiol. Biochem. - 2017. – Vol. 119. – P. 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.029>
- 12 Habib S.H., Kausar H., Saud H.M. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes // Biomed. Res. Int. – 2016. – Vol. 2016. - Art. ID 6284547. <https://doi.org/10.1155/2016/6284547>
- 13 Paré P.W., Zhang H.M., Aziz M., Xie X.T., Kim M.S., Shen X. Beneficial rhizobacteria induce plant growth: mapping signaling networks in *Arabidopsis* // Biocommun. Soil Microorg. Soil Biol. – 2011. – Vol. 23. – P. 403–412. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14512-4_15
- 14 Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 28, Issue 4. – P. 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

- 15 Chung E.J., Hossain M.T., Khan A., Kim K.H., Jeon C.O., Chung Y.R. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice // *Plant Pathol.* – 2015. – Vol. 31, Issue 2. – P. 152–164. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2014.0136>
- 16 Hamdia A.B.E., Shaddad M.A.K., Doaa M.M. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions // *Plant Growth Regul.* – 2004. – Vol. 44, Issue 2. – P. 165–174. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000049414.03099.9b>
- 17 Bharti N., Pandey S.S., Barnawal D., Patel V.K., Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – Art. ID 34768. <https://doi.org/10.1038/srep34768>
- 18 Upadhyay S.K., Singh D.P. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment // *Plant Biol. (Stuttg.)*. – 2015. – Vol. 17, Issue 1. – P. 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- 19 Arora N.K., Egamberdieva D., Mehnaz S., Li W.J., Mishra I. Editorial: Salt tolerant rhizobacteria: For better productivity and remediation of saline soils // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. ID 660075. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660075>
- 20 Kumar A., Singh S., Gaurav A.K., Srivastava S., Verma J.P. Plant growth-promoting bacteria: Biological tools for the mitigation of salinity stress in plants // *Front Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – Art. ID 1216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>
- 21 Verma H., Kumar D., Kumar V., Kumari M., Singh S.K., Sharma V.K., Droby S., Santoyo G., White J.F., Kumar A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – Art. ID 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
- 22 Moghaddam M.S.H., Safaie N., Soltani J., Hagh-Doust N. Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops // *Plant Physiol. Biochem.* – 2021. – Vol. 160. – P. 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.022>
- 23 Mbinda W., Mukami A. A review of recent advances and future directions in the management of salinity stress in Finger Millet // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – Vol. 12. – Art. ID 734798. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734798>
- 24 Ahluwalia O., Singh P.C., Bhatia R. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria // *Resources, Environment and Sustainability*. – 2021. – Volume 5. – Art. ID 100032. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032>
- 25 Mishra P., Mishra J., Arora N.K. Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants - Recent developments and prospects: A review // *Microbiol Res.* – 2021. – Vol. 252. – Art. ID 126861. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>
- 26 Adeleke B.S., Babalola O.O., Glick B.R. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes // *Rhizosphere*. – 2021. – Vol. 20. – Art. ID 100433. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433>
- 27 Afzal I., Shinwari Z.K., Sikandar S., Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants // *Microbiological Research*. – 2019. – Vol. 221. – P. 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- 28 Yadav K.K., Shrivastava N., Solanki A.C., Upadhyay S., Trivedi M. Actinobacteria interventions in plant and environment fitness // In: *Microbiomes and Plant Health*. – London: Academic Press, 2021. – P. 397–427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819715-8.00014-8>
- 29 Gong Y., Chen L.J., Pan S.Y., Li X.W., Xu M.J., Zhang C.M., Xing K., Qin S. Antifungal potential evaluation and alleviation of salt stress in tomato seedlings by a halotolerant plant growth-promoting actinomycete *Streptomyces* sp. KLBMP5084 // *Rhizosphere*. – 2020. – Vol. 16. – Art. ID 100262. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100262>
- 30 Qin S., Feng W.W., Wang T.T., Ding P., Xing K., Jiang J.H. Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the beneficial endophyte *Streptomyces* sp. KLBMP 5084 isolated from halophyte *Limonium sinense* // *Plant Soil*. – 2017. – Vol. 416. – P. 117–132. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3192-2>
- 31 Coombs J.T., Franco C.M. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed // *Appl Environ Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, Issue 7. – P. 4260–4262. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4260-4262.2003>

- 32 Саубенова М.Г. Полисахариды дрожжевых организмов. – Алма-Ата: «Наука» КазССР, 1976. – 112 с.
- 33 Олейникова Е.А., Еремекбай Ж.Е., Кердяшкин А.В., Алыбаева А.Ж., Амангелді А.А., Чижаева А.В., Саубенова М.Г., Кердяшкина Г.В., Елубаева М.Е. Эндоефитные микроорганизмы, повышающие устойчивость пшеницы к засухе // Микробиология және вирусология. – 2022. – №1(36). – С. 94-112. <https://doi.org/10.53729/MV-AS.2022.01.06>
- 34 Lee S., Lee D.K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? // Korean J Anesthesiol. – 2018. – Vol. 71, Issue 5. – P. 353-360. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>.
- 35 Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 458 с.
- 36 Mahyarudin, Rusmana I., Lestari Y. Metagenomic of *Actinomyces* Based on 16S rRNA and nifH genes in soil and roots of four indonesian rice cultivars using PCR-DGGE // HAYATI Journal of Biosciences. – 2015. – Vol. 22, Issue 3. – P. 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.001>
- 37 Gangwar M., Sheela Rani, Sharma N. Diversity of endophytic Actinomyces from wheat and its potential as plant growth promoting and biocontrol agents // Journal of Advanced Laboratory Research in Biology. – 2012. – Vol. 3, Issue 1. – P. 13-16. <https://core.ac.uk/download/pdf/188610104.pdf>
- 38 Deng S., Liu Y., Deng Z., Huang Y. Isolation of actinobacterial endophytes from wheat sprouts as biocontrol agents to control seed pathogenic fungi // Archives of Microbiology. – 2021. – Vol. 203, Issue 10. – P. 6163 – 6171. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02581-3>
- 39 Al-Askar A.A. Endophytic *Streptomyces olivaceiscleroticus* Endo-1: Biocontrol agent and growth promoter of wheat // Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2014. – Vol. 8, Issue 1. – P. 307-317.
- 40 Yandigeri M.S., Meena K.K., Singh D., Malviya N., Singh D.P., Solanki M.K., Yadav A.K., Arora D.K. Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions // Plant Growth Regulation. – 2012. – Vol. 68, Issue 3. – P. 411-420. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9730-2>

Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, М.Г. САУБЕНОВА¹, С.Т. ДАУГАЛИЕВА¹,
А.В. КЕРДЯШКИН², М.Е. ЕЛУБАЕВА¹, Г.В. КЕРДЯШКИНА¹

¹ Микробиология және вирусология ғылыми - өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

² Ботаника және фитоинтродукция институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

ЭНДОФИТТИ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ БИДАЙДЫҢ ТҰЗДАНУ ТӨЗІМДІЛІГІНЕ ӘСЕРІ

Түйін

Топырақтың тұздануы Қазақстан Республикасының күрделі проблемасы болып табылады. Дақылдардың тұздану стрессіне төзімділігін арттырудың бір жолы-өсімдіктердің әртүрлі зақымдайтын әсерлерге төзімділігін арттыратын эндофитті микроорганизмдер қауымдастығын пайдалану. Бұл жұмыста құрғақ жағдайда өсетін өсімдіктердің эндофиттерінің бидай көшеттерінің тұздану стрессіне төтеп беру қабілетіне әсерін көрсетеді. Синтетикалық ортадағы ең жақсы нәтижелерді *Erigeron canadensis* өсімдігінің *Streptomyces curacoii* түріне жататын бидайдың эндофитті актиномицетімен біріктірілген ассоциациясы көрсетті. Алдын ала натрий хлоридіне бейімделіп алынған эндофитті микроорганизмдердің негізгі өсімдіктің тұздануға төзімділік әсерін алғаш көрсеттік.

Кілтті сөздер: эндофиттер, бидай, тұзға төзімділік, бейімделу, актиномицеттер.

IRSTI: 68.03.07, 34.27.23, 34.27.51

Zh.N. YERMEKBAY¹, Ye.A. OLENIKOVA^{1*}, M.G. SAUBENOVA¹,
S.T. DAUGALIYEVA¹, A.V. KERDYASHKIN², M.Y. YELUBAEVA¹,
G.V. KERDYASHKINA¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Institute of Botany and Phytointroduction, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

INFLUENCE OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS ON WHEAT RESISTANCE TO SALINITY

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.07

Abstract

Soil salinization is a serious problem in the Republic of Kazakhstan. One of the ways to increase the tolerance of agricultural crops to salt stress is the use of communities of endophytic microorganisms, which increase the resistance of plants to various damaging effects. This work shows the influence of endophytes of plants growing in arid conditions on the ability of wheat seedlings to withstand salt stress. The best results on a synthetic medium were shown by an association from the plant *Erigeron canadensis* in combination with an endophytic wheat actinomycete assigned to the species *Streptomyces curacoi*. The influence of the preliminary adaptation of endophytic microorganisms to sodium chloride on the resistance of the host plant to salinity was shown by us for the first time.

Keywords: endophytes, wheat, salt tolerance, adaptation, actinomycetes.

On the territory of Kazakhstan, 41% of the soil is saline. They are especially widespread in the southern and central regions [1]. The widespread changes in climatic conditions, combined with irrational human activities, are causing serious damage to crop production, reducing yields and the quality of products. According to a rough estimate by the FAO, about 96.5% of agricultural land in the world is subject to abiotic stresses [2]. The most serious abiotic stress worldwide affecting plant growth and productivity through effects on several physiological and metabolic processes is associated with drought and salinity. An increase in salt concentration in both cases is the cause of the osmotic stress of plants and a rise in ionic toxicity, in which the rate of seed germination decreases, plant photosynthesis is inhibited, the integrity of cell membranes is lost, and the formation of reactive oxygen species is increased [3–5]. Excessive absorption and accumulation of sodium and chloride ions in plant tissues leads to a serious ion imbalance and functional disorders, namely, it prevents the absorption of elements necessary for growth and development, such as potassium ions, which leads to a decrease in productivity and possible death of plants [6].

Previously used breeding and transgenic technologies for increasing the resistance of cultivated plants, especially with regard to salt tolerance, have not yet been crowned with final success [7, 8]. Numerous studies have shown that plant tolerance to salt stress can be increased with the help of exogenous biostimulants such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) [9–12]. They are applicable to a wide range of crops to improve seed germination while increasing plant biomass and productivity [13–15]. Most PGPRs include various strains of *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhizobium* species [16, 17]. However, the protective properties of PGPR are not unlimited and, with increasing salinity, they lose their properties of promoting plant growth [18].

In the complex fight against the damaging effects of such abiotic factors as drought, salinity, low or high temperature, and stress associated with heavy metals, along with the traditional methods of using more resistant varieties of cultivated plants, the application of endophytic communities of microorganisms, which colonize plants and increase their ability to withstand various damaging effects, is becoming increasingly important [19–25].

The direct influence of endophytic microorganisms on the salt tolerance of plants is still extremely poorly studied. However, there are data on the alleviation of salt stress in tomato plants with the help of a halotolerant actinomycete [29]. Qin et al. [30] showed that endophytic actinomycetes contribute to the resistance of the halophytic plant *Limonium sinense*. It was also revealed that colonization of wheat by endophytic actinomycetes occurs at the earliest stages of development [31], which can be useful in the pretreatment of seeds.

In this work, endophytic actinomycetes of wheat were isolated and the effect of endophytic microorganisms isolated from various plants under drought conditions on the ability of wheat seedlings to withstand salt stress was studied. Based on previous experience in the field of increasing the resistance of microorganisms through adaptation to salt stress [32], it was also suggested that the pre-adaptation of endophytic microorganisms to salt stress could affect the salt tolerance of host plants.

Materials and methods

Previously identified associations of ОЖ-Рa and ОЖП of endophytic microorganisms from drought-resistant plants Canadian horseweed *Erigeron canadensis* and knotweed *Polygonum aviculare* living within Almaty and showing a positive effect on wheat growth under laboratory conditions of drought [33], were used in this work.

Endophytic microorganisms were isolated from wheat plants (*Triticum aestivum*) after 30 days of cultivation under laboratory conditions of atmospheric drought (starting from the 10th day from sowing) on soil taken outside Almaty near fields with cereal crops. To isolate endophytes, plant roots and stems were thoroughly washed, rinsed with sterile tap water, cut into pieces about 1 cm in size, treated successively with 70% ethanol, sodium hypochlorite, and again with 70% ethanol, then washed three times in sterile tap water. Next, pieces of the stem and root were separately ground in a mortar, and 1 ml of sterile water was added and inoculated on a mixture of media (1:1): meat-peptone agar (Nutrient agar, TM-Media, India) and Sabouraud (g/l: glucose 40, 0; peptone 10.0; agar-agar 20.0). As a control, part of the completely processed pieces of the stem and root were laid out on the surface of the medium in Petri dishes, and the water from the last washing was seeded. The inoculations were cultured at 30°C for 48 hours. The isolated actinomycetes were subsequently maintained on an actinomycete culture medium (TM Media, India).

For molecular genetic identification of actinomycetes, 16S rRNA sequencing according to Sanger was performed. For the phylogenetic tree, the sequences of reference strains of the Blast NCBI International Database were used. The tree was constructed using the Mega 11 program with sequence alignment according to ClustalW.

For the treatment of wheat seeds, associations of microorganisms ОЖ-Рa from *P. aviculare*, ОВТ from *E. canadensis*, and isolated actinomycetes were used. The constituent microorganisms were also additionally adapted to sodium chloride by successive transfers to the optimal medium supplemented with 2% NaCl. The effect of each association was investigated using non-adapted and adapted microorganisms.

To obtain associations, equal ratios of constituent microorganisms were used. Wheat seeds were sorted and seeds of the same size were selected. For one variant of the experiment, two Petri dishes with 15 seeds each were used. Seeds were evenly moistened with 1 ml of cell suspension (107 CFU/ml according to McFarland turbidity standard) in sterile tap water and spread on the surface of the prepared Kovrovtssev medium with the addition of sodium chloride (g/l: NaCl 10.0; MgSO₄ 1.0; K₂HPO₄ 1.0; CaHPO₄ 0.2; agar-agar 6.0; tap water). One ml of sterile tap water was used as a control. Plates were cultivated at 30°C. 3 days after sowing, the number of germinated seeds and the number of roots was taken into account. After 7 days, the length of the stem and the maximum length of the root were measured.

Statistical data processing was carried out in the Excel program using one-way ANOVA analysis of variance and post hoc tests. Dunnett's test [34, 35] was used to compare mean values with respect to control; Student's t-test was used for pairwise comparisons between treatment with

adapted and non-adapted variants of various associations. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

From the roots of wheat cultivated under conditions of atmospheric drought, several isolates of actinomycetes producing brown pigment in the medium were isolated. Among them, two isolates were selected, the most different in the degree of pigment production in the medium: Wh and 1zh2. Molecular genetic identification of the selected strains was carried out. The phylogenetic tree of wheat endophytic actinomycetes is shown in Figure 1.

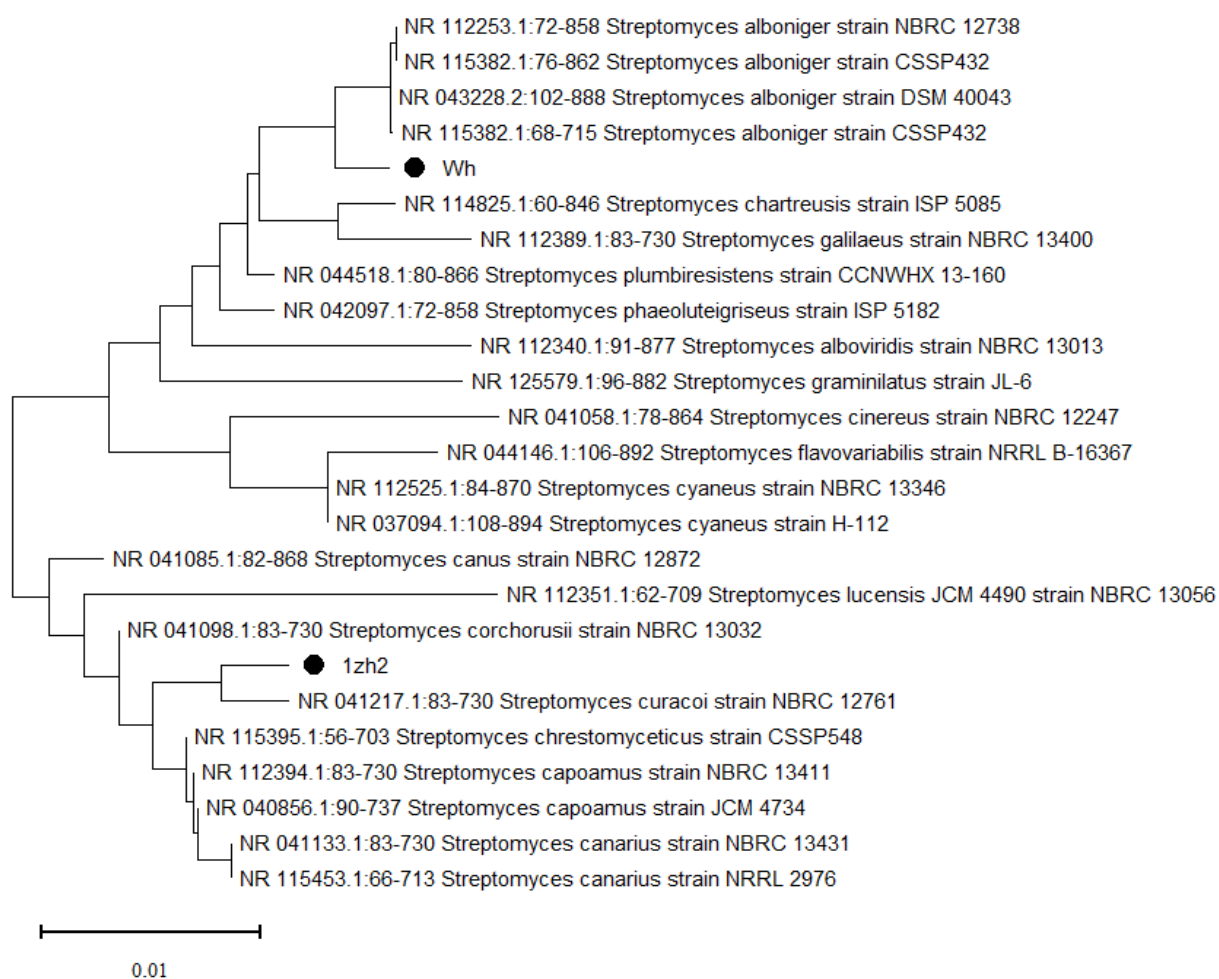


Figure 1 - Phylogenetic tree of endophytic actinomycetes of wheat cultivated in arid conditions

The degree of homology of the nucleotide sequence of the 1zh2 isolate with the closest strain NR 041217.1:83-730 *Streptomyces curacoi* NBRC 12761 was 99.38%, and that of the Wh isolate with the closest strain NR 043228.2:102-888 *Streptomyces alboniger* DSM 40043 was 99.37%. Based on the obtained results, endophytic actinomycetes were identified as *S. curacoi* 1zh2 and *S. alboniger* Wh.

The isolated actinomycetes were used together with associations of endophytic microorganisms of *E. canadensis* and *P. aviculare* for the presowing treatment of wheat seeds when cultivated on a medium with a high content of sodium chloride. Tables 1 and 2 show data on the effect of the presowing treatment of wheat seeds with associations of microorganisms, including those adapted to an increased concentration of sodium chloride.

Table 1 - Indicators of germination of wheat seeds (after 3 days) on Kovrovtssev's medium with the addition of 1% sodium chloride

Association	Variant	Number of seeds with stem sprouts, %	Average number of roots, pcs.
Control	No pretreatment	53	0.9±0,2
ОЖ-Па	Not adapted	87	1.5±0,2
	Adapted to NaCl	87	1.8±0,2*
ОЖП	Not adapted	97	2.3±0,2**
	Adapted to NaCl	93	2.0±0,4*
ОЖП + <i>S. alboniger</i> Wh	Not adapted	93	2.1±0,2**
	Adapted to NaCl	100	2.0±0,2**
ОЖП + <i>S. curacoii</i> 1zh2	Not adapted	83	1.6±0,2
	Adapted to NaCl*	94	2.3±0,2**

Note - ОЖ-Па a consortium of endophytic microorganisms from *P. aviculare*; ОЖП - a consortium of endophytic microorganisms from *E. canadensis*; * deviation relative to control is significant at p<0.05; ** at p<0.01; * in the column "Variant" means a statistically significant difference relative to the non-adapted variant.

Table 2 - Indicators of the development of wheat seedlings (after 7 days) on Kovrovtssev's medium with the addition of 1% sodium chloride

Association	Variant	Number of plants relative to sowing, %	Average root length, mm	Average stem length, mm
Control	No pretreatment	37	-	3.9±0,4
ОЖ-Па	Not adapted	27	2.6±0,2	3.6±0,4
	Adapted to NaCl	27	2.2±0,2	3.3±0,6
ОЖП	Not adapted	50	4.8*±0,2	5.6*±0,5
	Adapted to NaCl	40	3.9±0,3	5.5±0,7
ОЖП + <i>S. alboniger</i> Wh	Not adapted	37	3.6±0,3	4.4±0,4
	Adapted to NaCl	23	3.1±0,3	3.1±0,6
ОЖП + <i>S. curacoii</i> 1zh2	Not adapted	50	3.6±0,3	3.4±0,5
	Adapted to NaCl	60	4.4*±0,2	6.2*±0,2

Note - ОЖ-Па a consortium of endophytic microorganisms from *P. aviculare*; ОЖП - a consortium of endophytic microorganisms from *E. canadensis*; "-“ impossible to measure due to the spread of fungal infection; * the difference relative to the non-adapted variant is significant at p<0.05.

The data in Table 1 show that the seeds treated with endophytic microorganisms germinate faster on a medium supplemented with 1% sodium chloride compared to the untreated control. As early as 3 days after sowing, there is a difference in the number of germinated seeds and the length of wheat roots.

After 7 days (Table 2), the survival rate in the control was 37% in relation to the number of sown seeds, and in the variant with the treatment with sodium chloride-adapted microorganisms of the association from *E. canadensis*, including *S. curacoii* 1zh2, - 60%. The spread of fungal diseases of wheat had a significant impact on the results obtained (Figure 2). The absence of fungal infection in the variant with treatment with endophytic microorganisms also suggests that they

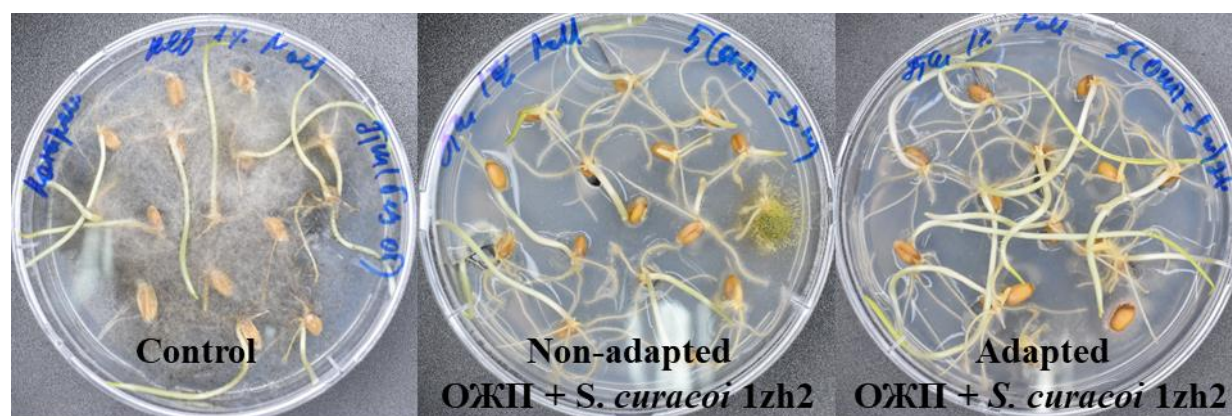


Figure 2 - The influence of endophytic microorganisms and their adaptation to sodium chloride on the salt tolerance of wheat seedlings

have antifungal activity. However, a separate study is needed to confirm this assumption.

The best results in terms of the ability of wheat seedlings to withstand salt stress were noted in the variant with the association of ОЖП microorganisms from *E. canadensis* and actinomycete *S. curacoii* 1zh2. The ОЖП association showed good results in terms of the length of roots and seedlings, also in the absence of *S. curacoii* 1zh2 and the use of unadapted variants. Pre-cultivation on a medium with 1% NaCl, on the contrary, somewhat reduced the survival rate and did not show statistically significant differences compared to the control. This difference can be explained by the fact that the main contribution to the protection of plants from salt stress in this association is made by the actinomycete culture. This conclusion is confirmed by the absence of a positive effect when using *S. alboniger* Wh. The association of ОЖ-Рa from *P. aviculare* also had no protective effect on salt stress.

Conclusion

Thus, the data obtained indicate the ability of associations of endophytic microorganisms to mitigate the impact of salt stress on wheat plants.

The study also expands the knowledge about the endophytic microbiota of wheat and the influence of endophytic microorganisms on resistance to salt stress. The literature contains data on the dominance of endophytic actinobacteria belonging to the species *S. alboniger* in rice roots [36], as well as on the isolation of various actinobacteria from various parts of wheat plants capable of stimulating growth and protecting against phytopathogenic fungi [37–39]. Yandigeri et al showed that endophytic actinobacteria could protect wheat plants under water stress conditions [40]. Information on the isolation and use of *S. curacoii* to protect wheat from salt stress was not found in the available scientific literature.

The influence of preliminary adaptation of endophytic microorganisms to sodium chloride on the resistance of the host plant to salinity was shown by us for the first time.

The results of the study will be used for the further development of a drug that promotes the survival of plants in saline conditions. This will help both avoid the negative impact of secondary salinization and expand the list of soils used for crop production in the future.

Funding

This research was funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP09258751).

References:

- 1 Isanova G.T., Abuduvajli C., Mamutov Zh.U., Kaldybaev A.A., Saparov G.A., Bazarbaeva T.A. Zasolennye pochvy i opredelenie provincii solenakopleniya na territorii Kazahstana. Aridnye jekosistemy. 2017. T. 23, No. 4(73). S. 35-43. <https://cyberleninka.ru/article/n/zasolennye-pochvy-i-opredelenie-provintsii-solenakopleniya-na-territorii-kazahstana>

- 2 Cramer G.R., Urano K., Delrot, S., Pezzotti M., Shinozaki K. Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. BMC Plant Biol. 2011. Vol. 11. Art.ID 163(2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- 3 Greenberg B.M., Huang X.D., Gerwing P., Yu X.M., Chang P., Wu S.S., Gerhardt K., Nykamp J., Yu X., Glick B., Gerwing P. Phytoremediation of salt impacted soils: greenhouse and the field trials of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth and salt phytoaccumulation. Proceeding of the 33rd AMOP Technical Seminar on Environmental Contamination and Response. Ottawa: Environment, 2008. P. 627–637.
- 4 Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. Annu Rev Plant Biol. 2008. Vol. 59. P. 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- 5 Xu Z., Jiang Y., Jia B., Zhou G. Elevated-CO₂ response of stomata and its dependence on environmental factors. Front Plant Sci. 2016. Vol. 7. Art. ID 657. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00657>
- 6 Shah A.N., Tanveer M., Abbas A., Fahad S., Baloch M.S., Ahmad M.I., Saud S., Song Y. Targeting salt stress coping mechanisms for stress tolerance in Brassica: a research perspective. Plant Physiol. Biochem. 2021. Vol. 158. P. 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.044>
- 7 Phang T.H., Shao G.H., Lam H.M. Salt tolerance in soybean. J. Integr. Plant Biol. 2008. Vol. 50. P. 1196–1212. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00760.x>
- 8 Zou P., Li K.C., Liu S., Xing R.G., Qin Y.K., Yu H.H., Zhou M., Li P. Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylation on wheat seedlings under salt stress. Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 126. P. 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.028>
- 9 Zou P., Lu X., Jing C., Yuan Y., Lu Y., Zhang C., Meng L., Zhao H., Li Y. Low-molecular-weight polysaccharides from *pyropia yezoensis* enhance tolerance of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) to salt stress. Front. Plant Sci. 2018. Vol. 9. Art. ID 427. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00427>
- 10 Upadhyay S.K., Singh D.P. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biol. (Stuttg). 2015. Vol. 17, Issue 1. P. 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- 11 Li L., Li L., Wang X., Zhu P., Wu H., Qi S. Plant growth-promoting endophyte *Piriformospora indica* alleviates salinity stress in *Medicago truncatula*. Plant Physiol. Biochem. 2017. Vol. 119. P. 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.029>
- 12 Habib S.H., Kausar H., Saud H.M. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. Biomed. Res. Int. 2016. Vol. 2016. Art. ID 6284547. <https://doi.org/10.1155/2016/6284547>
- 13 Paré P.W., Zhang H.M., Aziz M., Xie X.T., Kim M.S., Shen X. Beneficial rhizobacteria induce plant growth: mapping signaling networks in *Arabidopsis*. Biocommun. Soil Microorg. Soil Biol. 2011. Vol. 23. P. 403–412. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14512-4_15
- 14 Bhattacharyya P.N., Jha D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28, Issue 4. P. 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- 15 Chung E.J., Hossain M.T., Khan A., Kim K.H., Jeon C.O., Chung Y.R. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. Plant Pathol. 2015. Vol. 31, Issue 2. P. 152–164. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2014.0136>
- 16 Hamdia A.B.E., Shaddad M.A.K., Doaa M.M. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. Plant Growth Regul. 2004. Vol. 44, Issue 2. P. 165–174. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000049414.03099.9b>
- 17 Bharti N., Pandey S.S., Barnawal D., Patel V.K., Kalra A. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. Sci. Rep. 2016. Vol. 6. Art. ID 34768. <https://doi.org/10.1038/srep34768>
- 18 Upadhyay S.K., Singh D.P. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biol. (Stuttg). 2015. Vol. 17, Issue 1. P. 288–293. <https://doi.org/10.1111/plb.12173>
- 19 Arora N.K., Egamberdieva D., Mehnaz S., Li W.J., Mishra I. Editorial: Salt tolerant rhizobacteria: For better productivity and remediation of saline soils. Front. Microbiol. 2021. Vol. 12. Art. ID 660075. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660075>

- 20 Kumar A., Singh S., Gaurav A.K., Srivastava S., Verma J.P. Plant growth-promoting bacteria: Biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. *Front Microbiol.* 2020. Vol. 11. Art. ID 1216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>
- 21 Verma H., Kumar D., Kumar V., Kumari M., Singh S.K., Sharma V.K., Droby S., Santoyo G., White J.F., Kumar A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. *Microorganisms.* 2021. Vol. 9. Art. ID 1729. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081729>
- 22 Moghaddam M.S.H., Safaie N., Soltani J., Hagh-Doust N. Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops. *Plant Physiol. Biochem.* 2021. Vol. 160. P. 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.022>
- 23 Mbinda W., Mukami A. A review of recent advances and future directions in the management of salinity stress in Finger Millet. *Frontiers in Plant Science.* 2021. Vol. 12. Art. ID 734798. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734798>
- 24 Ahluwalia O., Singh P.C., Bhatia R. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability.* 2021. Volume 5. Art. ID 100032. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032>
- 25 Mishra P., Mishra J., Arora N.K. Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants - Recent developments and prospects: A review. *Microbiol Res.* 2021. Vol. 252. Art. ID 126861. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>
- 26 Adeleke B.S., Babalola O.O., Glick B.R. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere.* 2021. Vol. 20. Art. ID 100433. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433>
- 27 Afzal I., Shinwari Z.K., Sikandar S., Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research.* 2019. Vol. 221. P. 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- 28 Yadav K.K., Shrivastava N., Solanki A.C., Upadhyay S., Trivedi M. Actinobacteria interventions in plant and environment fitness. In: *Microbiomes and Plant Health.* – London: Academic Press, 2021. P. 397-427. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819715-8.00014-8>
- 29 Gong Y., Chen L.J., Pan S.Y., Li X.W., Xu M.J., Zhang C.M., Xing K., Qin S. Antifungal potential evaluation and alleviation of salt stress in tomato seedlings by a halotolerant plant growth-promoting actinomycete *Streptomyces* sp. KLBMP5084. *Rhizosphere.* 2020. Vol. 16. Art. ID 100262. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100262>
- 30 Qin S., Feng W.W., Wang T.T., Ding P., Xing K., Jiang J.H. Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the beneficial endophyte *Streptomyces* sp. KLBMP 5084 isolated from halophyte *Limonium sinense*. *Plant Soil.* 2017. Vol. 416. P. 117–132. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3192-2>
- 31 Coombs J.T., Franco C.M. Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol.* 2003. Vol. 69, Issue 7. P. 4260-4262. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4260-4262.2003>
- 32 Saubenova M.G. Polisaharidy drozhzhevyh organizmov. Alma-Ata: «Nauka» KazSSR, 1976. 112 s.
- 33 Oleinikova Y.A., Yermekbay Z.N., Kerdyashkin A.V., Alybayeva A.Z., Amangeldi A.A., Chizhayeva A.V., Saubenova M.G., Kerdyashkina G.V., Yelubaeva M.Y. Endophytic microorganisms increasing wheat resistance to drought. *Microbiology and Virology.* 2022. No. 1(36). S. 94-112. <https://doi.org/10.53729/MV-AS.2022.01.06>
- 34 Lee S., Lee D.K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? *Korean J Anesthesiol.* 2018. Vol. 71, Issue 5. P. 353-360. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>
- 35 Glanc S. Mediko-biologicheskaja statistika. M.: Praktika, 1999. 458 s.
- 36 Mahyarudin, Rusmana I., Lestari Y. Metagenomic of *Actinomycetes* Based on 16S rRNA and nifH genes in soil and roots of four indonesian rice cultivars using PCR-DGGE. *HAYATI Journal of Biosciences.* 2015. Vol. 22, Issue 3. P. 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2015.10.001>
- 37 Gangwar M., Sheela Rani, Sharma N. Diversity of endophytic Actinomycetes from wheat and its potential as plant growth promoting and biocontrol agents. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology.* 2012. Vol. 3, Issue 1. P. 13-16. <https://core.ac.uk/download/pdf/188610104.pdf>
- 38 Deng S., Liu Y., Deng Z., Huang Y. Isolation of actinobacterial endophytes from wheat sprouts as biocontrol agents to control seed pathogenic fungi. *Archives of Microbiology.* 2021. Vol. 203, Issue 10. – P. 6163 – 6171. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02581-3>

39 Al-Askar A.A. Endophytic *Streptomyces olivaceiscleroticus* Endo-1: Biocontrol agent and growth promoter of wheat. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2014. Vol. 8, Issue 1. P. 307-317.

40 Yandigeri M.S., Meena K.K., Singh D., Malviya N., Singh D.P., Solanki M.K., Yadav A.K., Arora D.K. Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions. Plant Growth Regulation. 2012. Vol. 68, Issue 3. P. 411-420. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9730-2>

МРНТИ: 34.27.23

А.Ж. ІЗМҰҚАН^{1*}, А.С. КИСТАУБАЕВА¹, А.С. МАШЖАН¹, Н. БИРКЕЛАНД²,
И.С. САВИЦКАЯ¹

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

²Университет Бергена, Берген, Норвегия

*e-mail: izmukan@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРМОЗИМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖАРКЕНТСКОГО ГЕОТЕРМАЛЬНОГО ИСТОЧНИКА

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.08

Аннотация

Объектами исследования служили термофильные бактерии, обитающие в горячих источниках Жаркента Алматинской области. Способность этих микроорганизмов поддерживать жизнедеятельность в экстремальных условиях демонстрирует их потенциал для биотехнологических процессов. Выделено четыре бактериальных изолята с оптимальной температурой роста от 75°C и 85°C. Четыре бактериальных изолята охарактеризованы по морфологическим, микроскопическим, биохимическим показателям. Все полученные изоляты подвергнуты скринингу на амилазную, протеазную, липазную и целлюлазную активность. Полученные изоляты предварительно идентифицированы как *Bacillus* sp. по морфологическим, биохимическим и физиологическим характеристикам.

Ключевые слова: термозимы, геотермальные источники, изоляты.

Термофильные бактерии являются одной из наиболее обширных и активно изучаемых групп экстремофильных микроорганизмов [1-3]. Термофильные и гипертермофильные микроорганизмы интересны для биотехнологии, главным образом, как продуценты высокоспецифичных термостабильных ферментов.

Продуцируемые ими ферменты, так называемые термозимы, имеют ряд биотехнологических преимуществ: высокая устойчивость ферментативных реакций при высоких температурах, устойчивость к высоким концентрациям субстрата из-за снижения вязкости раствора и увеличения коэффициентов диффузии. Термостабильные ферменты зачастую обладают повышенной устойчивостью к денатурирующим агентам [2]. Применение в индустрии ферментативного гидролиза обусловлено строгой специфичностью и направленным действием ферментов, и, соответственно, возможностью управления процессом трансформации веществ и получения на выходе чистого целевого продукта. Кроме того, процесс гидролиза осуществляется при температуре 70-80°C. Это, с одной стороны, препятствует развитию патогенных бактерий, которые могут присутствовать в сырье для переработки. С другой стороны, при такой температуре не происходит разрушения незаменимых аминокислот [4, 5].

Постоянный поиск новых термофильных прокариот проводится для того, чтобы найти бактерии с биотехнологически привлекательными свойствами. Таким образом, поиск новых термофильных бактерий гидролитиков остается актуальной проблемой исследований с научной и прикладной точек зрения [6, 7].

В связи с этим, ранее нами была сформирована уникальная коллекция аэробных и анаэробных термофильных бактерий, выделенных из термального источника Алматинской области Жаркентского геотермального горячего источника, расположенного на 43°97'14.93"N, 79°66'12.09"E, 273 км от города Алматы [8].

Цель исследования - выделение термофильных бактерий из геотермального горячего источника Алматинской области, определение термостойкости изолятов, проведение скрининга и получение изолятов с широким спектром гидролазной активности.

Материалы и методы

Место исследования и сбор образцов. Жаркентский геотермальный горячий источник расположен на 43°97'14.93"N, 79°66'12.09"E, 273 км. от города Алматы, не доходя до города Жаркент, в 80 км от границы с Китаем. Несколько скважин находятся в пределах города Жаркент, во впадинах урочища Жаркунак. Жаркунакское месторождение подземных вод является центральной частью Жаркентского геотермального источника, включающего скважины № 5539, 1-РТ. Все скважины расположены в пределах территории землепользования ТОО "Байсерек-Агро" [8].

Химический состав скважины № 5539 характеризуется как слабоминерализованный щелочной, умеренно радоновый, кремнистый, преимущественно хлоридно-бикарбонатно-натриевый с высокой концентрацией содержания фтора. Характерными особенностями воды являются слабая минерализация (до 1,0 г/дм³), щелочная реакция (pH 8,1–9,0), высокое содержание фтора (до 10 мг/дм³), бальнеологически активная концентрация кремниевой кислоты (свыше 50 мг/дм³), наличие радона в концентрациях до 60 пCi/л, свойственные для умеренно радоновых вод [8].

Выделение бактерий. Пробы воды и осадков из горячих источников отбирались в пластиковые пробирки типа «Falcon» объемом 15 мл, заполняя весь объем без воздушных пустот. Перед отбором проб в источниках определяли температуру, значения pH среды.

Пробы воды вносились в мясопептонный бульон (HiMedia, Индия) при 80°C, по истечению 3 суток обогащенную культуру высевали на питательный агар (HiMedia, Индия) для получения отдельных колоний. Все бактериальные изоляты, полученные на чашках Петри, отбирались и очищались методом истощающего штриха. Изоляты были определены как чистые после микроскопирования колоний культур.

Определение термоустойчивости. Для исследования термофильных характеристик каждый бактериальный изолят инокулировался в 10 мл питательной бульонной среды (HiMedia, Индия) в течение 3 дней при 80°C. Каждую бульонную культуру бактерий высевали на свежеприготовленную питательную агаровую среду и 24 часа культивировали при 75°C и 80°C. Бактериальные изоляты отбирались и повторно тестировались на термостойкость при более высокой температуре, 85°C, в течение 3 суток. В итоге, для дальнейшего изучения были отобраны изоляты, которые могли переносить температуру 85°C.

Морфологическая и биохимическая характеристика изолятов. Изучены изоляты термофильных бактерий по различным морфологическим признакам, а именно: цвет, окраска по Граму, форма, образование спор и подвижность.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) выделенных бактерий. Морфологические признаки выделенных штаммов бактерий были дополнительно исследованы методом СЭМ анализа при поддержке института ПВХ "ННЛОТ" КазНУ. Образец для СЭМ готовили путем переноса микробных изолятов в чистую пробирку для микрофугирования, содержащую примерно 1,5 мл 3,5% раствора глутарового альдегида. Затем изоляты промывали фосфатным буфером (100 мм, pH 7,2), следом - изоляты обезвоживали с использованием спиртового градиента от 10 до 95%. Далее обезвоженные образцы высушивались на воздухе и закреплялись на углеродном носителе. Образец покрывали тонким слоем серебра. Подготовленные образцы исследовались под растровым электронным микроскопом - Raster electron microscope Quanta 3D 200i Dual system (FEI Company, USA) SEM.

Проведены биохимические исследования, такие как ферментация сахаров, образование H₂S, окисление Mn и Fe, отношение к кислороду, или аэрации, наличие каталазы и оксидазы по методикам, описанным Прескоттом et al [9-11]. Газообразование определяли на скошенном TSI agar (HiMedia, Индия) [12, 13].

Оценка ферментативной продукции. Скрининг и идентификацию термофильных бактерий, продуцирующих гидролазы, проводили с использованием различных субстратов, таких как карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) - по Рамешу et al [14], картофельный крахмал -

по Бласам et al [15], твин 80 - по Донг-Бу et al [16], и обезжиренное молоко - по Халед et al [17].

Результаты и обсуждение

Из Жаркентского геотермального источника выделено четыре бактериальных изолята, которым были присвоены следующие кодовые названия: AC2S, AC3S, AC4S, AC5S. Два из них были отнесены к грамотрицательным бактериям: AC2S, AC3S; и два изолята AC4S, AC5S были грамположительными.

Проведено физиолого-биохимическое исследование изолятов с помощью различных идентификационных тестов: на каталазу и оксидазу, ферментацию сахаров (глюкозы, сахарозы, лактозы), отношение к кислороду (таблица 1).

Таблица 1- Биохимическая характеристика бактериальных изолятов, полученных из Жаркентского геотермального источника

Биохимические тесты	AC2S	AC3S	AC4S	AC5S
Сероводородный тест	-	-	-	-
Каталаза	+	+	+	+
Оксидаза	+	-	+	-
Гидролиз крахмала	+	+	+	+
Ферментация сахаров				
Глюкоза	+	-	+	+
Сахароза	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-
Окисление Mn	+	+	-	-
Окисление Fe	-	-	-	-
Облигатный аэроб	-	-	-	-
Факультативный анаэроб	+	+	+	+
Подвижность	+	+	+	+
Образование эндоспор	+	+	+	+
Символы: + указывают на положительный показатель; - отрицательный показатель				

Установлено, что все исследуемые изоляты не относились к облигатным аэробам, не окисляли Fe, показали отрицательный результат на сероводородный тест. Однако положительную реакцию они проявили на каталазную активность, на гидролиз крахмала, на окисление Mn. Кроме того, выявлено, что они сбрасывали все испытанные сахара, образовывали оксидазу и были факультативными анаэробами.

Изоляты отличались между собой и по морфологическим характеристикам: колонии бактерий AC4S были окрашены в бело-кремовый цвет, формы и структуры колоний были неправильной формы, а колонии AC2S, AC3S, AC5S были круглыми с ровными краями (таблица 2). У всех бактериальных изолятов изучались ростовые характеристики.

Таблица 2 - Морфология колоний изолятов, выделенных из Жаркентского геотермального источника

Изоляты	Консистенция	Форма	Края	Профиль колоний	Цвет
1	2	3	4	5	6
AC2S	Слизистая, Гладкая	Круглая	Ровные	Плоский	Кремовый
AC3S	Гладкая	Круглая	Рельефные	Плоский	Бело-кремовый
AC4S	Слизистая	Неправильная	Ровные	Выпуклый	Бело-кремовый
AC5S	Слизистая, Гладкая	Круглая	Ровные	Выпуклый	Белый

Морфологические характеристики всех изолятов были исследованы на СЭМ при различных увеличениях от 6,000X до 36,556X.

Сканирующая электронная микрофотография изолятов представлена на рисунке 1.

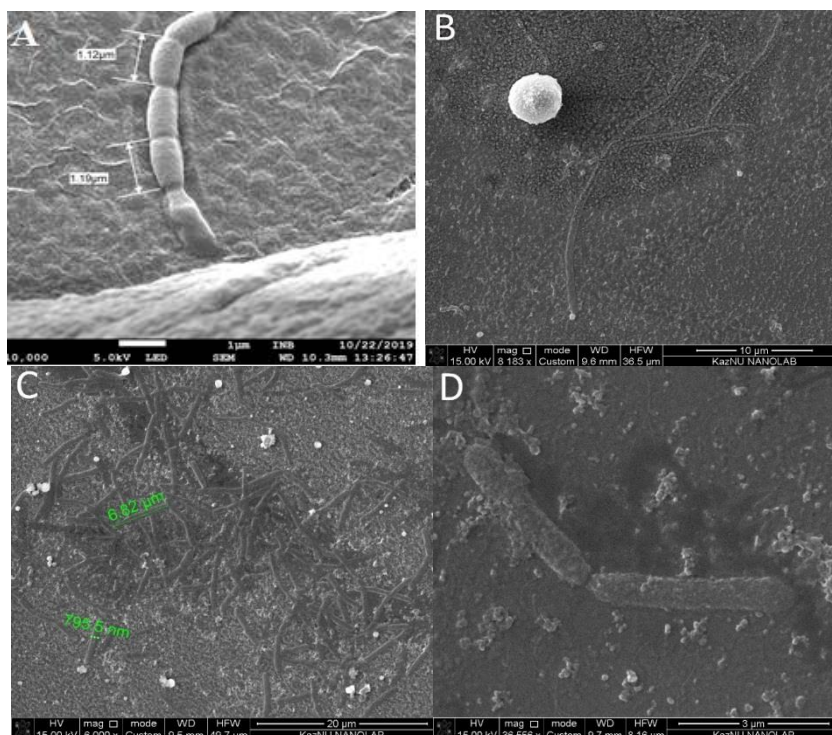


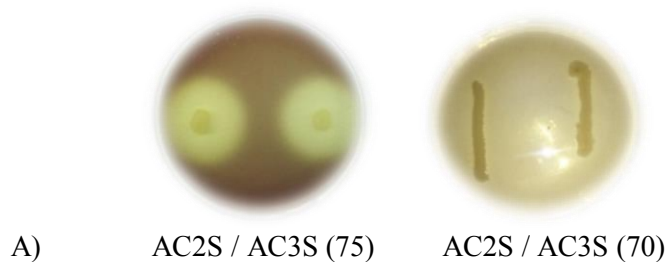
Рисунок 1 - Сканирующая электронная микрофотография изолятов.

A. AC2S B. AC3S (8,183X), C. AC4S (6,000X), D. AC5S (36,556X)

На микрофотографиях видно, что бактериальные изоляты: AC2S, AC3S, AC4S, AC5S имеют палочковидную форму размером 1,8x3,1 x 4,1 -0,6 мкм. При выращивании на обогащенной питательной среде имеют вид толстых и больших палочек, иногда расположенных в цепочках (рисунок 1).

На следующем этапе микробные изоляты подвергались скринингу на термостойкость при различных температурах, начиная с 40°C до 95°C. Для изолятов AC2S, AC3S оптимальная температура роста составляла 75°C, а максимальная и минимальная - 95°C и 45°C. Для изолятов AC4S, AC5S оптимальная температура составляла 85°C, а максимальная и минимальная - 95°C и 40°C.

Затем бактериальные изоляты подвергались скринингу на амилазную, протеазную, липазную и целлюлазную активность (рисунок 2).



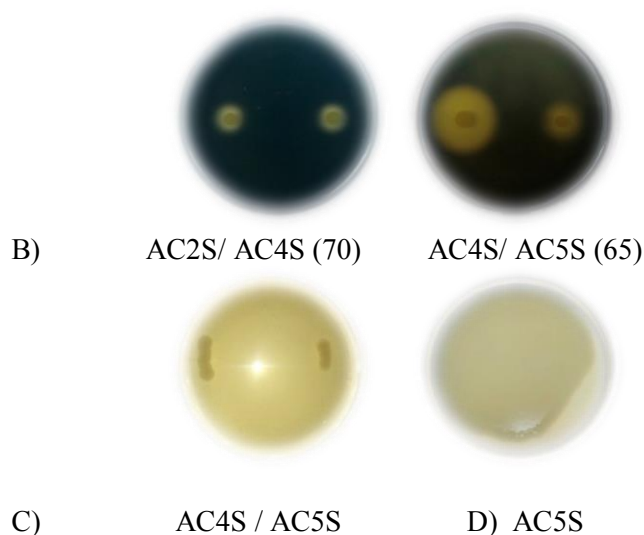


Рисунок 2 - Ферментативная активность изолятов, выделенных из Жаркентского геотермального горячего источника. А) целлюлазная активность, В) амилазная активность, С) липазная активность, D) протеазная активность.

Оценка результатов проводилась по определению диаметра зон гидролиза субстратов (рисунок 2).

Как видно из таблицы 3, три изолята (AC2S; AC4S; AC5S) производили амилазу при 75°C, причём AC2S и AC4S проявляли амилазную активность на 52-54% больше, чем штамм AC5S при 75°C, однако при 80°C изолят AC5S проявляет амилазную и целлюлазную активности больше, чем на 75% при 75°C. Другие два изолята (AC3S; AC4S) продуцировали протеазу при 75°C, однако при 80°C у этих изолятов отсутствовала протеазная активность.

Кроме того, низкую протеазную активность при 75°C проявляли AC2S и AC4S, а при 80 °C и 85 °C у всех изолятов протеазной активности не наблюдалось, у изолята AC2S при 75°C наблюдалась липазная активность, тогда как при других температурных режимах липаза не производилась.

В результате анализа данных, представленных в таблице 3, можно сделать вывод о том, что при оптимальном температурном режиме, 75°C, изолят AC2S может производить одновременно 3 различных биокатализатора, такие как: целлюлаза, амилаза и липаза.

Такое же количество термозимов (целлюлаза, амилаза и протеаза) при 75°C может выделять и изолят AC4S, однако при 80°C этот изолят производит со средней активностью только два фермента - целлюлазу и амилазу, напротив, высокую активность к этим ферментам при таком температурном режиме может проявлять изолят AC5S.

Таблица 3 – Зона гидролиза субстратов (мм) в зависимости от температурного режима (°C)

Изоляты	Температура роста, °C	Целлюлаза	Амилаза	Протеаза	Липаза
1	2	3	4	5	6
AC2S	75	39±7	16±2	-	23±3
AC3S	75	-	-	5±1	-
AC4S	75	25±2	18±2	7±1	-
AC5S	75	9±1	7±1	-	-
AC2S	80	-	-	-	-
AC3S	80	-	-	-	-
AC4S	80	20±2	15±2	-	-
AC5S	80	35±2	28±1	-	-
AC2S	85	-	-	-	-

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
AC3S	85	-	-	-	-
AC4S	85	-	-	-	-
AC5S	85	-	-	-	-
Символы: (–) отсутствие активности.					

Таким образом, в проведенных исследованиях получены потенциальные промышленно-ценные изоляты термофильных бактерий, которые могут быть продуцентами термозимов для биотехнологии.

Заключение

Исследование показало, что Жаркентские горячие источники являются богатым источником ценных термофильных микроорганизмов - продуцентов промышленно важных ферментов, термозимов, для использования их в различных промышленных и биотехнологических процессах.

Финансирование

Проведенное исследование финансируется Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (№ гранта AP14871683 «Биотехнология переработки кератиновых побочных продуктов с помощью иммобилизованных термофильных бактерий»).

Литература:

- Colletier J.P., Aleksandrov A., Coquelle N., Mraihi S., Mendoza-Barbera E., Field M., Madern D. (2012) Sampling the conformational energy landscape of a hyperthermophilic protein by engineering key substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 29, no. 6, pp. 1683–1694.
- Tehei M., Madern D., Franzetti B., Zaccari G., (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 49, pp. 40974–40979.
- Liszka M.J., Clark M.E., Schneider E., Clark D.S. (2012) Nature versus nurture: Developing enzymes that function under extreme conditions. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 3, pp. 77–102.
- Adrio J.L., Demain A.L. (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, vol. 4, pp. 117–139.
- Binod P., Palkhiwala P., Gaikawari R., Nampoothiri K.M., Duggal A., Dey K., Pandey A. (2013) Industrial enzymes—Present status and future perspectives for India. *J. Sci. Ind. Res. India*, vol. 72, no. 5, pp. 271–286.
- Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Tang, J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 33, pp. 183–209.
- Kumar L., Awasthi G., Singh B. (2011) Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. no. 2, 10, pp. 1–15.
- Мендебаев Т.Н. Геотермальная энергетика. Ресурсы в Казахстане и технологическая схема их освоения // Новости науки Казахстана. – 2017. – №3. – С. 57-67.
- Prescott L. M., Harley G. P., and Klein D. E. (1993) Microbiology. W. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, USA. vol. 2, pp. 588-591.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. and. Staley J.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Nineteenth edition, Williams and Wilkins company, Baltimore, MD, USA, pp: 255-273.
- Murray, Baron, Jorgenson, Landry and Pfaller. (2007) Manual of clinical microbiology. American society for microbiology, Washington, Dc, no 9, pp.1-10
- Harley J.P. and Prescott L.M. (2002) Laboratory Exercise in Microbiology 5th ed, The McGraw-Hill Companies, pp. 1-466.
- Sharma K. (2007) Manual of Microbiology: Tools and Techniques. 2nd ed. Ane Books India, New Delhi. ISBN(10): 81-8052-143-5.
- Ramesh Ch. K., Richa S. et al. (2008) Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* vol. 57, no. 10, pp.503-507.

15 Blasam T. M., Hala I., Al D., Atef J., Saleh AL., Christian K. (2017) Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *Inter. J. of Microbiology*. pp. 1-12.

16 Dong-Woo L., You-Seok K., Ki-Jun K., et al. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 179, pp. 393 – 400.

17 Khaled E. El-Gayar, Mohamed A., Al Abboud and Ashraf M. M. Essa. (2017) Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from two Hot Springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol.11, no. 2, pp. 1-10.

А.Ж.ІЗМҰҚАН¹, А.С. КИСТАУБАЕВА¹, А.С. МАШЖАН¹, Н. БИРКЕЛАНД²,
И.С. САВИЦКАЯ¹

¹әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

²Берген Университеті, Берген, Норвегия

*e-mail: izmukan@mail.ru

ЖАРКЕНТ ГЕОТЕРМАЛДЫҚ СУЫНАН БӨЛІНГЕН ТЕРМОЗИМДЕР- ПРОДУЦЕНТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Түйін

Зерттеу нысандары ретінде Алматы облысының Жаркент ыстық бұлақтарында мекендейтін термофильді бактериялар қолданды. Бұл микроорганизмдердің экстремалды жағдайларда тіршілікке бейімделуін олардың биотехнологиялық процестер үшін әлеуетін көрсетеді. Оңтайлы өсу температурасы 75°C және 85°C болатын төрт бактериялық изолят бөлінді. Төрт бактериялық изолят морфологиялық, микроскопиялық, биохимиялық көрсеткіштермен сипатталды. Алынған барлық изоляттар амилаза, протеаза, липаза және целлюлоза белсенділігіне скринингтен өтті. Алынған изоляттар морфологиялық, биохимиялық және физиологиялық сипаттамалары бойынша *Bacillus sp* ретінде алдын ала анықталды.

Кілтті сөздер: термозимдер, геотермальды көздер, изолят.

IRSTI: 34.27.23

A.Zh. IZMUKAN^{1*}, A.S. KISTAUBAYEVA¹, A.S. MASHZHAN¹, N. BIRKELAND²,
I.S. SAVITSKAYA¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²University of Bergen, Bergen, Norway

*e-mail: izmukan@mail.ru

THE STUDY OF THERMOZYME-PRODUCERS ISOLATED FROM ZHARKENT GEOTHERMAL HOT SPRING

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.08

Abstract

The objects of the study were thermophilic bacteria living in the hot springs of Zharkent in the Almaty region. The ability of these microorganisms to maintain vital activity in extreme conditions demonstrates their potential for biotechnological processes. Four bacterial isolates were isolated, with an optimal growth temperature of 75°C and 85°C. Four bacterial isolates were characterized by morphological, microscopic, and biochemical parameters. All obtained isolates were screened for amylase, protease, lipase and cellulase activity. The obtained isolates were preliminarily identified as *Bacillus sp.* according to morphological, biochemical and physiological characteristics.

Keywords: thermozymes, geothermal sources, isolate.

Thermophilic bacteria are one of the most extensive and actively studied groups of extremophilic microorganisms [1-3]. Thermophilic and hyperthermophilic microorganisms are interesting for biotechnology, mainly as producers of highly specific thermostable enzymes.

The enzymes produced by them, the so-called thermozymes, have several biotechnological advantages: high stability of enzymatic reactions at high temperatures, resistance to high substrate concentrations due to a decrease in the viscosity of the solution and an increase in diffusion coefficients. Thermostable enzymes often have increased resistance to denaturing agents [2]. The use of enzymatic hydrolysis in the industry is due to the strict specificity and directed action of enzymes, and, accordingly, the possibility of controlling the process of transformation of substances and obtaining a pure target product at the output. In addition, the hydrolysis process is carried out at a temperature of 70-80°C. This, on the one hand, prevents the development of pathogenic bacteria that may be present in raw materials for processing. On the other hand, at this temperature, there is no destruction of essential amino acids [4, 5].

The constant search for new thermophilic prokaryotes is carried out to find bacteria with biotechnologically attractive properties. Thus, the search for new thermophilic hydrolytic bacteria remains an urgent research problem from a scientific and applied point of view [6, 7].

In this regard, we have formed a unique collection of aerobic and anaerobic thermophilic bacteria isolated from the thermal spring of the Almaty region of the Zharkent geothermal hot spring located at 43°97'14.93" N, 79°66'12.09"E, 273 km from the city of Almaty [8].

The study aimed to isolate thermophilic bacteria from the geothermal hot spring of the Almaty region and determine the heat resistance of the isolates, as well as to screen and obtain isolates with a wide spectrum of hydrolase activity.

Materials and methods

Place of research and collection of samples. Zharkent geothermal hot spring is located at 43°97'14.93" N, 79°66'12.09" E, 273 km from the city of Almaty, near Zharkent city, and 80 km away from the border with China. Several wells are located within the Zharkent, in the depressions of the Zharkunak tract. The Zharkunak underground water deposit is the central part of the Zharkent geothermal source, including well No. 5539 (1-RT). All wells are located within the land use territory of LLP "Bayserek-Agro" [8].

The chemical composition of well No. 5539 is characterized as a weakly mineralized alkaline, moderately radon, siliceous mainly chloride-bicarbonate-sodium composition with a high concentration of fluorine content. The characteristic features of this water are weak mineralization (up to 1.0 g/dm³), alkaline reaction (pH 8.1–9.0), high fluorine content (up to 10 mg/dm³), the balneological active concentration of silicic acid (over 50 mg/dm³), the presence of radon in concentrations up to 60 nCi/l, characteristic of moderately radon waters [8].

Isolation of bacteria. Samples were taken in Falcon tubes with a volume of 15 ml. Samples of water and precipitation were taken from hot springs, filling the entire volume of the tube without air voids. Before sampling, the temperature and pH values of the medium were determined in the sources.

A water sample was introduced into a meat-peptone broth (HiMedia, India) at 80°C, and for 3 days the enriched culture was sown on nutrient agar (HiMedia, India) to obtain individual colonies. All bacterial isolates obtained on Petri dishes were selected and purified by the streak plate method. The isolates were determined to be pure after microscopy of the culture colonies.

Determination of thermal stability. To study the thermophilic characteristics, each bacterial isolate was inoculated in 10 ml of nutrient broth medium (HiMedia, India) and incubated for 3 days at 80°C. Each broth culture of bacteria was sown on a freshly prepared nutrient agar medium and cultured at 75°C and 80°C for 24 hours. Bacterial isolates growing in Petri dishes were selected and retested for heat resistance at a higher temperature of 85°C for 3 days. As a result, isolates that could tolerate a temperature of 85°C were selected for further study.

Metabolic and biochemical characteristics of isolates. Isolates of thermophilic bacteria have been studied according to various morphological characteristics, like colour, Gram staining, shape, spore formation, and mobility.

Scanning electron microscopy (SEM) of isolated bacteria. Morphological features of the isolated bacterial strains were further investigated by the SEM analysis method with the support of the SSE "NNLOT" KazNU Institute. The sample for SEM was prepared by transferring microbial isolates into a clean microfugation tube containing approximately 1.5 ml of 3.5% glutaraldehyde solution. Then the isolates were washed with a phosphate buffer (100 mm, pH 7.2). After the isolates are dehydrated using an alcohol gradient from 10 to 95%. Then the dehydrated samples were dried in air and fixed on a carbon carrier. The samples were coated with a thin layer of silver. These samples were then observed under a scanning electron microscope - Raster electron microscope Quanta 3D 200i Dual system (FEI Company, USA) SEM.

Various biochemical studies have been carried out, such as the fermentation of sugars, the H₂S formation, the oxidation of Mn and Fe, obligate aerobes, facultative anaerobes, and the presence of catalase and oxidase enzymes investigated by the methods described by Prescott et al. [9-11]. The gas formation was determined using a TSI slant agar (HiMedia, India) [12, 13].

Evaluation of enzymatic products. Screening and identification of thermophilic bacteria producing hydrolase were carried out using various carbon sources, such as carboxymethyl cellulose (CMC) according to Ramesh et al. [14], potato starch according to Blasam et al. [15], twin 80 according to Dong-Woo et al. [16], and skimmed milk according to Khaled et al. [17].

Results and discussion

Four bacterial isolates were isolated from the Zharkent geothermal source, which was assigned the following code names: AC2S, AC3S, AC4S, and AC5S. Two of them were classified as Gram-negative bacteria: AC2, AC3S; and two isolates AC4S, and AC5S were Gram-positive.

Further, a physiological and biochemical study of the isolates was carried out using various identification tests: for catalase and oxidase, fermentation of sugars (glucose, sucrose, lactose), and oxygen ratio (Table 1).

Table 1- Biochemical characteristics of bacterial isolates obtained from the Zharkent geothermal source

Biochemical tests	AC2S	AC3S	AC4S	AC5S
Hydrogen sulfide test	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Fermentation of sugars				
Glucose	+	-	+	+
Sucrose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Oxidation of Mn	+	+	-	-
Oxidation of Fe	-	-	-	-
Obligate aerobe	-	-	-	-
Facultative anaerobe	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
Formation of endospores	+	+	+	+
Symbols: + indicate a positive indicator; - negative indicator				

The studied isolates showed negative results on the hydrogen sulfide test, were not obligate aerobes and did not oxidize Fe. However, they showed a positive reaction to catalase activity, starch hydrolysis, and Mn oxidation. In addition, they showed good enzyme reactions to sugars, and oxidase and were facultative anaerobes.

The obtained isolates differed among themselves in morphological characteristics: the colonies of AC4S bacteria were coloured white-cream, the shapes and structures of the colonies

were irregular, and the colonies of AC2S, AC3S, AC5S were round with even edges (Table 2). Growth characteristics were studied in all bacterial isolates.

Table 2 - Morphology of colonies of four isolates isolated from the Zharkent geothermal source

Isolates	Consistency	Form	Edges	Colony type	Color
AC2S	Slimy, Smooth	Round	Smooth	Flat	Creamy
AC3S	Smooth	Round	Wavy	Flat	White and creamy
AC4S	Slimy	Irregular	Smooth	Convex	White and creamy
AC5S	Slimy, Smooth	Round	Smooth	Convex	White

Further, the morphological characteristics of all isolates were studied on SEM at various magnifications from 6,000X to 36,556X.

Scanning electron micrography of isolates is shown in Fig. 1.

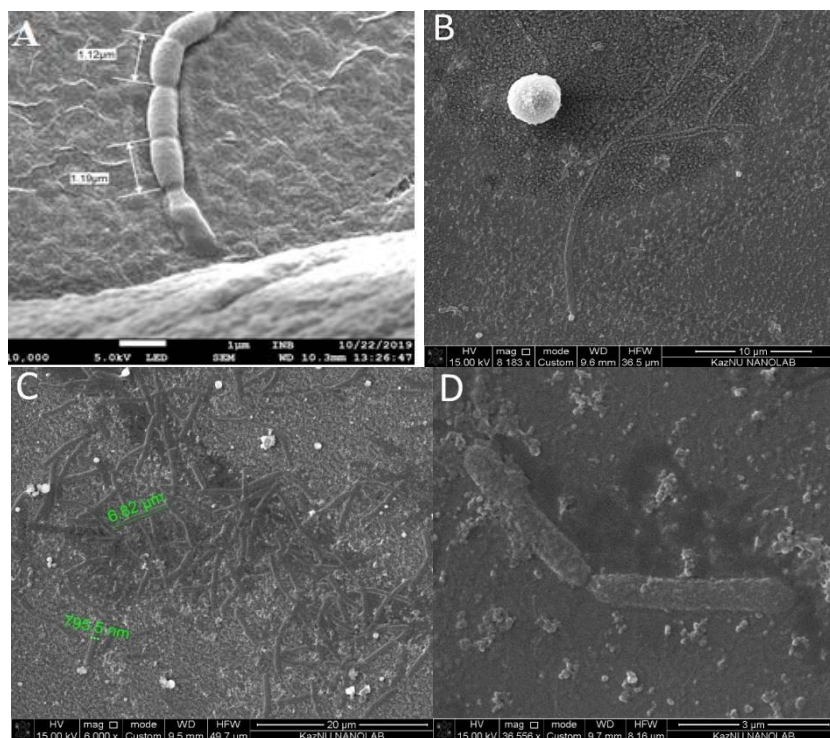


Figure 1 - Scanning electron micrography of isolates.

A. AC2S B. AC3S (8,183X), C. AC4S (6,000X), D. AC5S (36,556X)

Microphotographs showed that bacterial isolates: AC2S, A3S, AC4S, and AC5S had a rod-shaped shape with a size of 1.8x3.1 x 4.1 -0.6 microns. When grown on an enriched medium, they look like thick and large sticks, sometimes arranged in chains (Fig. 1).

At the next stage, microbial isolates were screened for heat resistance at various temperatures ranging from 40 ° C to 95 ° C. For AC2S and AC3S isolates, the optimal growth temperature was 75°C, and the maximum and minimum were 95°C and 45°C. For AC4S and AC5S isolates, the optimal temperature was 85°C, and the maximum and minimum were 95°C and 40°C.

Then bacterial isolates isolated from the hot spring were screened for amylase, protease, lipase and cellulase activity (Fig.2).

Isolates were screened for the content of enzymes. 4 isolated microorganisms were tested for the presence of secreted cellulase, amylase, protease and lipase. The results were evaluated by determining the diameter of the hydrolysis zones of the substrates shown in Figure 2.

Among the four identified isolates, at least two extracellular hydrolyzed enzymes were produced by each isolate (Table 3).

As can be seen from Table 3, three isolates (AC2S; AC4S; AC5S) produced amylase at 75°C, and AC2S and AC4S showed amylase activity by 52-54% more than the AC5S strain at 75°C, however, at 80°C, the AC5S isolate shows amylase and cellulase activity by more than 75% at 75°C. The other two isolates (AC3S; AC4S) produced protease at 75°C, but at 80°C these isolates had no protease activity.

In addition, low protease activity at 75°C showed AC2S and AC4S, and at 80°C and 85°C, protease activity was not observed in all isolates, and lipase activity was observed in AC2S isolate at 75°C at other temperature conditions, lipase was not produced.

As a result of the analysis of the data presented in Table 3, it can be concluded that at an optimal temperature regime of 75°C with AC2S isolates, it can simultaneously produce 3 different biocatalysts, such as cellulase, amylase and lipase.

The same number of enzymes (cellulase, amylase and protease) at 75°C can also secrete AC4S isolate, but at 80°C this isolate can produce only two enzymes with average activity cellulase and amylase, on the contrary, AC5S isolate can show high activity to these enzymes at this temperature regime.

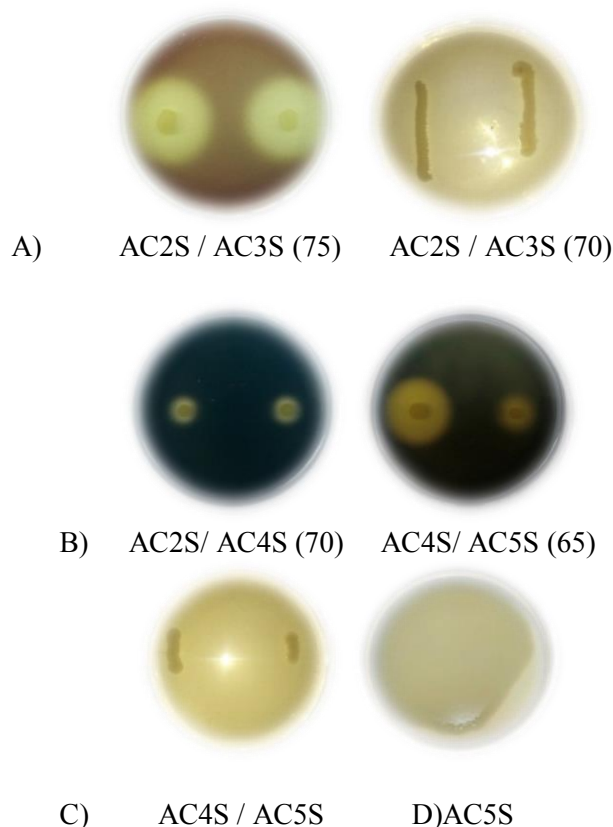


Figure 2 - Enzymatic activity of isolates obtained from the Zharkent geothermal hot spring.

A) cellulase activity, B) amylase activity, C) lipase activity, D) protease activity.

Table 3- The zone of hydrolysis of substrates (mm) depending on the temperature regime (° C)

Isolates	Optimal temperature	Cellulase	Amylase	Protease	Lipase
AC2S	75	39±7	16±2	-	23±3
AC3S	75	-	-	5±1	-
AC4S	75	25±2	18±2	7±1	-
AC5S	75	9±1	7±1	-	-
AC2S	80	-	-	-	-
AC3S	80	-	-	-	-
AC4S	80	20±2	15±2	-	-
AC5S	80	35±2	28±1	-	-
AC2S	85	-	-	-	-
AC3S	85	-	-	-	-
AC4S	85	-	-	-	-
AC5S	85	-	-	-	-
Symbols: (-) No activity.					

Thus, in our research, we have obtained potential industrially valuable isolates of thermophilic bacteria that may be attractive for biotechnology.

Conclusion

The study showed that the Zharkent hot springs are a rich source of many thermophilic microorganisms and should be investigated to obtain industrially important enzymes. These isolates can be used in various extreme industrial and biotechnological processes after studying and cloning their genes.

Funding

This research has been funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP14871683 «Biotechnology of processing keratin by-products using immobilized thermophilic bacteria»).

Conflict of interest

The authors state that they have no conflict of interest.

References:

- 1 Colletier J.P., Aleksandrov A., Coquelle N., Mraihi S., Mendoza-Barbera E., Field M., Madern D. (2012) Sampling the conformational energy landscape of a hyperthermophilic protein by engineering key substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 29, no. 6, pp. 1683–1694.
- 2 Tehei M., Madern D., Franzetti B., Zaccari G., (2005) Neutron scattering reveals the dynamic basis of protein adaptation to extreme temperature. *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 49, pp. 40974–40979.
- 3 Liszka M.J., Clark M.E., Schneider E., Clark D.S. (2012) Nature versus nurture: Developing enzymes that function under extreme conditions. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 3, pp. 77–102.
- 4 Adrio J.L., Demain A.L. (2014) Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, vol. 4, pp. 117–139.
- 5 Binod P., Palkhiwala P., Gaikawari R., Nampoothiri K.M., Duggal A., Dey K., Pandey A. (2013) Industrial enzymes—Present status and future perspectives for India. *J. Sci. Ind. Res. India*, vol. 72, no. 5, pp. 271–286.
- 6 Pikuta, E.V., Hoover, R.B., Tang, J. (2007) Microbial extremophiles at the limits of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 33, pp. 183–209.
- 7 Kumar L., Awasthi G., Singh B. (2011) Extremophiles: A novel source of industrially important enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. no. 2, 10, pp. 1–15.
- 8 Mendibaev T.N. (2017) Geotermalnaja energija. Resursi v Kazakhstane i texnologijeskaja sxema ix osvoenie. *Novosty nayki Kazakhstana*. vol. 3, pp. 57-67.

- 9 Prescott L. M., Harley G. P., and Klein D. E. (1993) Microbiology. W. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, USA. vol. 2, pp. 588-591.
- 10 Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. and Staley J.T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Nineteenth edition, Williams and Wilkins company, Baltimore, MD, USA, pp: 255-273.
- 11 Murray, Baron, Jorgenson, Landry and Pfaller. (2007) Manual of clinical microbiology. American society for microbiology, Washington, Dc, no 9, pp.1-10
- 12 Harley J.P. and Prescott L.M. (2002) Laboratory Exercise in Microbiology 5th ed, The McGraw-Hill Companies, pp. 1-466.
- 13 Sharma K. (2007) Manual of Microbiology: Tools and Techniques. 2nd ed. Ane Books India, New Delhi. ISBN(10): 81-8052-143-5.
- 14 Ramesh Ch. K., Richa S. et al. (2008) Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr Microbiol.* vol. 57, no. 10, pp.503-507.
- 15 Blasam T. M., Hala I., Al D., Atef J., Saleh AL., Christian K. (2017) Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *Inter. J. of Microbiology.* pp. 1-12.
- 16 Dong-Woo L., You-Seok K., Ki-Jun K., et al. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 179, pp. 393 – 400.
- 17 Khaled E. El-Gayar, Mohamed A., Al Abboud and Ashraf M. M. Essa. (2017) Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from two Hot Springs in Jazan, Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol.11, no. 2, pp. 1-10.

FTAMP: 34.27.17

Г.Т. ДЖАКИБАЕВА^{1*}, А.И. БАЙДАЛИНОВ¹, О.Н. ШЕМШУРА¹,
Э.О. ИЗМАЙЛОВА², Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Химия және фитотехнология институты, Бишкек, Қырғызстан

*e-mail: j.gulnar60@mail.ru

КОНСОРЦИУМҒА КІРЕТІН КОЛЛЕКЦИЯЛЫҚ СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ ЖӘНЕ ЛАКТОЗАНЫ АШЫТАТЫН АШЫТҚЫЛАР МЕН СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ БЕЛСЕНДІЛІГІ

doi:10.53729/MV-AS.2022.04.09

Түйін

Мақалада консорциумға кіретін сүт қышқылы бактериялары мен лактозаны ашытатын ашытқылардың, микробиология және вирусология ҒӨО-ның микроорганизмдер коллекциясында сақтаудағы, сондай-ақ минералды майда сақталған сүт қышқылы бактерияларының тіршілікке қабылеттілігі мен қышқыл түзетін белсенділігі туралы эксперименттік мәліметтер келтірілген. Алынған мәліметтер сүт қышқылы бактерияларының коллекциялық штамдарымен салыстырғанда консорциумға кіретін сүт қышқылы бактериялары мен лактозаны ашытатын ашытқылардың қышқыл түзу қабілетінің жақсы екенін көрсетеді.

Кілтті сөздер: қышқыл түзетін белсенділік, сүт қышқылы бактериялары, лактозаны ашытатын ашытқы, тішілікке қабылеттілік, популяцияның өзгергіштігі.

Сүт қышқылы тамақ өнеркәсібінде; сусындар, мармелад, консервілеу үрдістерінде кеңінен қолданылады [1]. Ол, сондай-ақ азық даярлау өндірісінде және ауыр өнеркәсіпте қолданылады. Сүт қышқылы жақсы полимерленеді. Оған деген сұраныс; одан биологиялық ыдырайтын полимерлер, оттегімен қаныққан заттар, өсімдіктердің өсуін реттегіштер және арнайы мақсаттағы химиялық өнімдер алу үшін шикізат ретінде пайдалану мүмкіндігіне байланысты өсті [2]. Сүт қышқылының микробиологиялық синтезі химиялыққа қарағанда әлдеқайда тиімді [3-6]. Пробиотиктердің құрамын кіретін сүт қышқылын өндірушілер - гомоферментативті сүт қышқылы бактериялары адамдар мен жас төлдерді емдеу үшін қолданылады [7,8].

Сүт қышқылын өндіруді оңтайландыру жұмыстарының маңызды бағыты - сүт қышқылын ашытатын өндірушілердің биологиялық қасиеттерін зерттеу, белсенді гомоферментативті сүт қышқылы бактерияларын таңдау, биосинтез үрдісін басқарудың параметрлерін оңтайландыру. Зерттеу мен қолдану да маңызды микроорганизмдердің таңдап алынған дақылдарының өсуіне және қышқыл түзілу үрдісінің тиімділігіне оңтайлы жағдайларды пайдалану [9]. Азот пен көміртегі көздері, рН, температура, культура титрі - сүт қышқылын өндірушіге және оның өнімділігіне әсер ететін өсіру әдісі сияқты факторлар арқылы анықталады [10].

Л.А. Банникова өз жұмысында атап өткендей, сүт қышқылы бактерияларының жекелеген штамдарының қасиеттері, сондай - ақ олардың комбинациясы бірқатар көрсеткіштер бойынша бағаланады, олар ең алдымен мыналарды қамтиды: қышқыл түзуші белсенділік - сүт қышқылының белгілі бір изомерін қалыптастыру үшін лактозаның бөліну жылдамдығы мен тереңдігі [11, 12]. С. Штеффен және басқалар сүт қышқылы бактерияларының әртүрлі штамдары түзетін сүт қышқылының конфигурациясына әртүрлі факторлардың әсерін зерттеді. Белгілі болғандай, уақыттың өзгеруі, инкубация температурасы, рН және қоректік орта құрамы, сүт қышқылының конфигурациясына айтарлықтай әсер еткен жоқ. Зерттелген лактококк штамдарының көпшілігі Р-лактат, *L. bulgaricus* және *L. lactis* штамдары - тек R-лактат, ал *L. helveticus* және *L. acidophilus* - екеуі де бірдей мөлшерде изомерлер шығарады [13]. Түзілген сүт қышқылының формасы

лактобактериялардың белгілі бір түріне тән [14]. Сүт қышқылы бактерияларының қышқыл түзетін белсенділігі олардың сүттегі өсу қарқыны мен ферментативті белсенділігіне байланысты. Сүтте өсу қарқыны төмен және тиісінше әлсіз қышқыл түзетін қабілеті бар лактобактериялардың жекелеген түрлеріне қосымша өсу факторлары қажет (ашытқы автолизаты, жүгері сығындысы және т.б.) [15, 16]. Қышқыл түзілу белсенділігі құрамында лактоза бар пробиотиктердің ерекше белсенділігінің нормаланатын көрсеткіші және тиісінше жаңа бактериялық препараттарды әзірлеу кезінде лактобактерия штаммдарын іріктеу критерийі болып табылады [17].

Материалдар мен әдістер

Жұмыста Алматы облысы Қаскелең ауданында– сүттен бөліп алынған сүт қышқылы микроорганизмдері (*Lactococcus lactis* K-1, *Lactobacterium bulgaricus* K-3, *Streptococcus thermophilus* K-2, *Streptococcus lactis* 6, *Lactococcus lactis* 8) және лактозаны ашытатын ашытқылар (*Saccharomyces lactis* 19 және *Saccharomyces lactis* 14с) пайдаланылды.

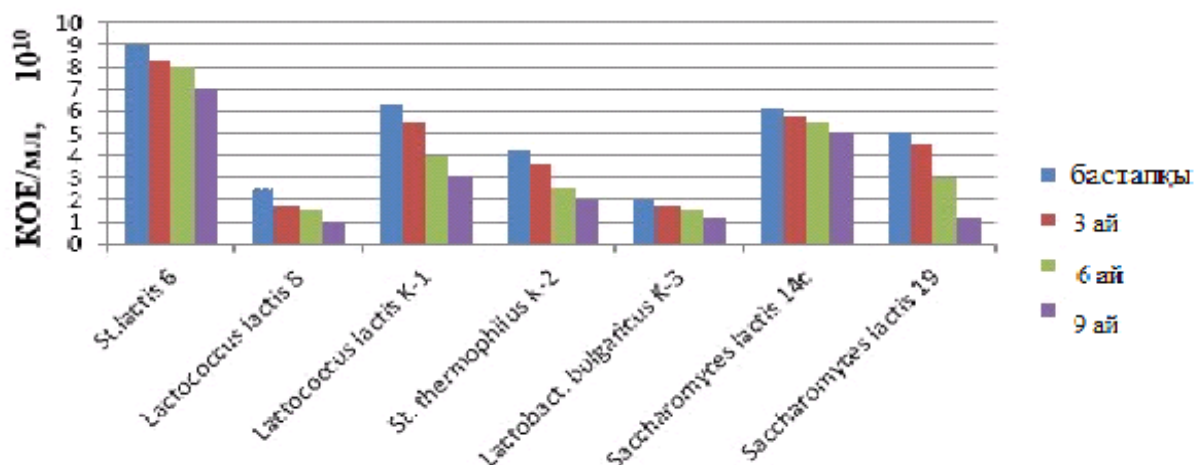
Сүт қышқылы микроорганизмдерін өсіру үшін MRS ортасы пайдаланылды [18]. Ортадағы көміртегі көзі – глюкоза, азот көзі – ашытқы сығындысы болды. Тіршілікке қабілетті жасушалардың саны (КОЕ/мл немесе титр) сынаманы 10 рет сұйылту және MRS және Сабуро агар қосылған ортасына себу әдісімен анықталды [19, 20].

Қышқыл түзілу энергиясын анықтау. 10 мл стерильді майы алынған сүттен тұратын түтікке зерттелетін штаммның 1 ілмегі енгізіліп, оңтайлы температурада (30-37°C) 16 сағат ішінде термостатта өсіріп (қышқыл түзілу энергиясын анықтаған кезде), содан кейін титрленетін қышқылдық анықталды [21].

Титрленетін қышқылдықты анықтау. 10 мл сынамаға 20 мл дистилденген H₂O және 2 тамшы 1% фенолфталеин қосылды. Содан кейін сынамалар 0,1 NaOH сәл қызғылт бояу пайда болғанға дейін титрленді. Титрлеуге жіберілген және 10-ға көбейтілген NaOH көлемі (мл) Тернер градусымен (°T) көрсетілген титрленетін қышқылдықтың көрсеткіші болды [22].

Нәтижелер және талқылау

Әр түрлі сақтау мерзімінен кейін сүт қышқылы бактерияларының және лактозаны ыдырататын ашытқылардың тіршілікке қабылеттілігі 10^7 - 10^9 ерітіндісінен 3 дана Петри табақшаларындағы (орташа есеппен) MRS және Сабуро агар қосылған ортасында өсіріп есептелінді, инкубациядан кейінгі колонияларды санау кезінде $30 \pm 1^\circ\text{C}$ және $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 48 сағат ішінде өсірілген, микроорганизмдердің тіршілік ету пайызы, минералды май қабаты астында сақтағаннан кейін колония құраушы бірліктер (КҚБ) санының орташа мәні логарифмге қатысты табылды. Деректер Стьюденттің 1 критерийі бойынша өңделді (қателер келтірілмеген, өйткені тұжырымдар айқын айырмашылықтарға негізделген).



Сурет 1- Минералды май қабаты астында сақталғаннан кейін консорциумға кіретін сүт қышқылы микроорганизмдерін және лактозаға ашытқыларды бөлек өсіру кезіндегі жасушалар санының өзгеруінің салыстырмалы диаграммасы

Минералды май қабаты астында сақтауға салынған АХЖ және лактозаны ашытатын ашытқылардың тіршілікке қабылеттілігі 9 айдан кейін 10-23% - ке дейін төмендегені анықталды. (1-сурет). Сонымен, *Lactococcus lactis 8* және *Lactobacterium bulgaricus K-3* екі штаммының тіршілік ету деңгейі, минералды май қабатының астында сақтау мерзімінің соңында 42–53,5% дейін төмендеді. *Streptococcus lactis 6* штаммы ең тұрақты болып шықты, оның максималды тіршілік ету деңгейі 9 ай сақтағаннан кейін 81,9% құрады.

Лактобактериялармен органикалық қышқылдардың (сүт қышқылын) түзілуі шартты-патогенді микроорганизмдерге қатысты антагонистік белсенділік тетіктерінің бірі болып саналады. Осыған байланысты қышқыл түзілу динамикасын зерттеу лактобактериялардың биологиялық қасиеттерін сипаттауда маңызды кезең ретінде қарастырылады. Біз стерильденген майы алынған сүтте лактобактерияларды өсіру кезінде титрленетін қышқылдықтың өзгеру динамикасын анықтадық.

Кесте 1 - Ұю ұзақтығына байланысты минералды май қабаты астында сақтағаннан кейін консорциумға кіретін сүт қышқылы бактерияларының және лактоза ашытатын ашытқылардың қышқыл түзуші белсенділігі

Сүт қышқылы бактерияларының және лактозаны ашытатын ашытқылардың штамдары	Ұйыту ұзақтығы 3% ұйытқыны енгізу кезінде, сағат	Титрленетін қышқылдық, °T			
		Бастапқы	3 ай	6 ай	9 ай
1	2	3	4	5	6
<i>Streptococcus lactis 6</i>	16	75	70	65	55
<i>Lactococcus lactis 8</i>	16	97	85	60	52
<i>Lactococcus lactis K-1</i>	16	80	70	60	55
<i>Streptococcus thermophilus K-2</i>	16	100	85	75	63
<i>Lactobacterium bulgaricus K-3</i>	16	95	80	75	65
<i>Saccharomyces lactis 14c</i>	16	200	195	180	170
<i>Saccharomyces lactis 19</i>	16	210	200	190	180

Ең белсенді қышқыл өнімдері лактозаны ашытатын ашытқылардың штамдары екендігі анықталды. *Saccharomyces lactis 14c* -200°T және *Saccharomyces lactis 19* - 210°T, орташа қышқыл түзушілер сүт қышқылы бактерияларының штамдары болды; *Lactococcus lactis 8* - 97°T, *Streptococcus thermophilus K-2* - 100°T, *Lactobacterium bulgaricus K-3* – 95 °T, әлсіз қышқыл түзгіш *Streptococcus lactis 6* - 75°T, *Lactococcus lactis K-1* -80°T минералды май қабатының астында сақтау процесінде сүт қышқылы бактериялары және лактоза

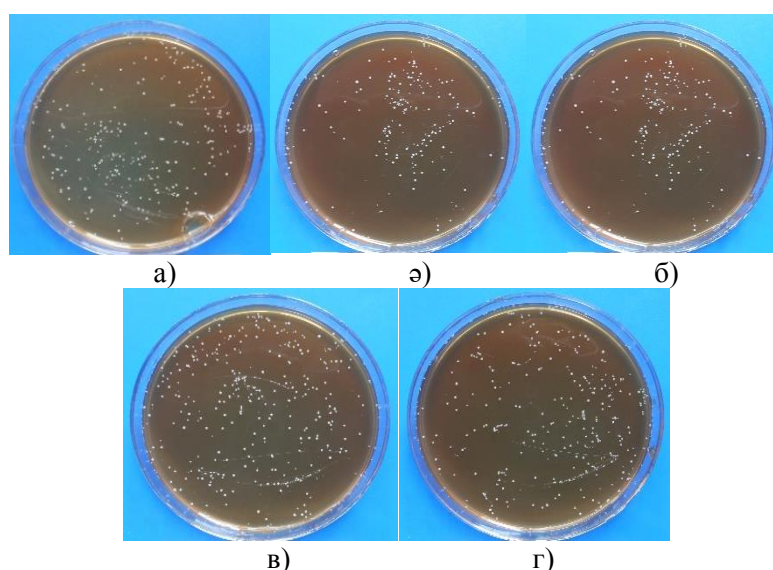
ашытатын ашытқылардың қышқыл түзуші белсенділігінің өзгеруіне қатысты (1-кесте) 9 ай ішінде бұл көрсеткіш 5-18% - ден аспайтындай мөлшерде төмендегені анықталды. Ерекшелік *Lactococcus lactis* 8 штаммында болды, оның белсенділігі 45%-ке төмендеді.

Ең белсенді қышқылдандырғыштар; *Lactobacillus casei* 139 - 60°Т, *Lactobacillus plantarum* 53h - 55°Т және *Lactobacillus salivarius* 8g - 50°Т, *Lactobacillus curvatus* 18g- 45°Т және *Lactobacillus acidophilus* 27w - 42°Т, әлсіз қышқыл түзушілер - *Lactobacillus curvatus* 18g-45°Т және *Lactobacillus acidophilus* 27w-42°Т, әлсіз қышқыл түзгіштер *Lactobacillus plantarum* 2 - 22°Т және *Lactobacillus cellobiosus* 20-20°Т болды (2-кесте).

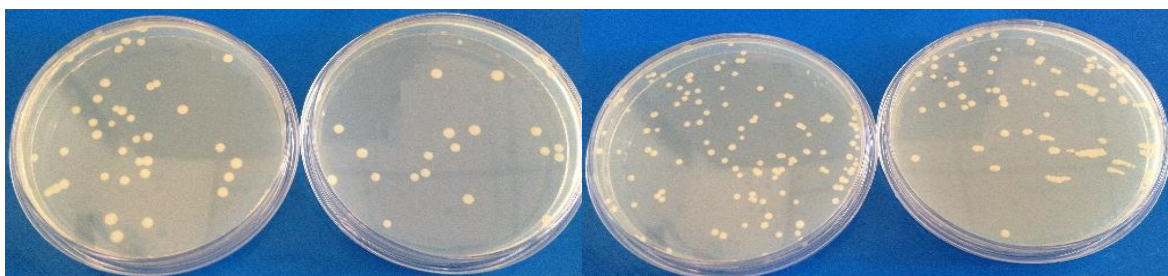
Кесте 2-Коллекциялық сүт қышқылы бактерияларының қышқыл түзуші белсенділігі

Сүт қышқылды бактериялардың коллекциялық штаммдары	Ұйыту ұзақтығы 3% ұйытқыны енгізу кезінде, сағат	Қышқылдың түзілуі, бастап	Өсу температурасы, °С
1	2	3	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	16	22	35
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	16	35	35
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53H	16	55	35
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27W	16	42	35
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18g	16	45	35
<i>Lactobacillus casei</i> 139	16	60	35
<i>Lactobacillus casei</i> 173a	16	30	35
<i>Lactobacillus salivarius</i> 8g	16	50	35
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	16	35	35
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	16	20	35

№1 консорциумның (*Lactococcus lactis* K-1, *Streptococcus thermophilus* K-2, *Lactobacterium bulgaricus* K-3 және лактоза ашытқысы *Saccharomyces lactis* 19) және консорциум №6, *Streptococcus* (*Streptococcus* №2) популяциясының өзгергіштігіне зерттеу жүргізілді. *Lactococcus lactis* 8, *Saccharomyces lactis* 14c), сүт қышқылы бактерияларының штаммдары гетерогенділігін көрсетті. Тығыз қоректік ортаның бетінде сүт қышқылы бактерияларының диаметрі 2-4 мкм шамасында, дөңес, дөңгелек, шеті тегіс, ақ түсті колониялар түзілетіні 2-суретте көрсетілген.

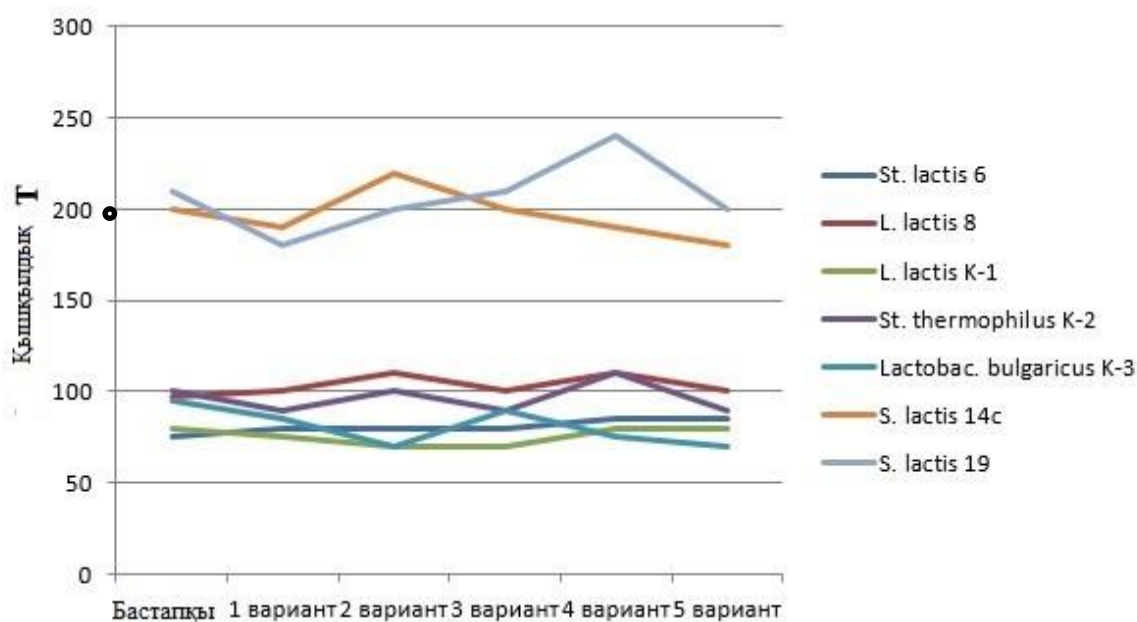


Сурет 2 - Сүт қышқылды бактерияларының популяциялық өзгергіштігі
Ескерту: а) *Lactococcus lactis* K-1, ә) *Streptococcus thermophilus* K-2, б) *Lactobacterium bulgaricus* K-3, в) *Streptococcus lactis* 6, г) *Lactococcus lactis* 8



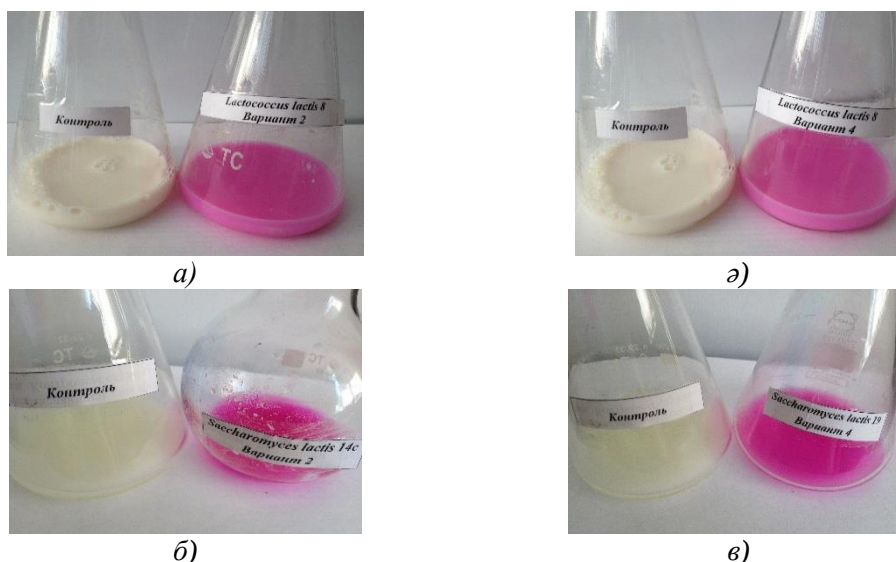
Сурет 3 - лактоферментациялаушы ашытқылардың морфологиясы көрсетілген. Тығыз қоректік ортаның бетінде лактозаны ашытатын ашытқылар диаметрі 6-8 мкм шамасында дөңес, дөңгелек, шеті тегіс, ақ түсті колониялар түзеді

Сүт қышқылының ең перспективалы штамм-продуцентін таңдау үшін сүт қышқылы бактерияларының 5 культурасының және лактозаны ашытатын ашытқылардың 2 культурасының қышқыл түзу қабілеті зерттелді. Сүт қышқылы бактериялар колониясының және лактозаны ашытатын ашытқылардың 5 нұсқасы таңдалды.



Сурет 4 - Консорциумға кіретін сүтқышқылы бактериялар мен лактозаны ашытатын ашытқылардың тандап алынған нұсқаларында қышқылдықтың өзгеру динамикасын анықтау

Сүт қышқылы бактериялардың *Lactococcus lactis* 8 және *Streptococcus thermophilus* K-2 штамдарының тандап алынған 5 нұсқасының ішінде ең белсенді болып №2 және №4 нұсқалары табылады. *Streptococcus lactis* 6, *Lactococcus lactis* K-1 штамдарында орташа қышқыл түзетін №4 және №5 нұсқалары және *Lactobacterium bulgaricus* K-3 штаммындағы №1 және №3 нұсқалары анықталды. Белсенді қышқыл түзу қабілеті лактозаны ашытатын *Saccharomyces lactis* 14c және *Saccharomyces lactis* 19 ашытқыларында №2 және №4 нұсқаларында көрінді (сурет- 4).



Ескерту: а) *Lactococcus lactis* 8 №2 нұсқасы; ә) № 4 нұсқа *Lactococcus lactis* 8; б) №2 нұсқа *Saccharomyces lactis* 14 с; в) *Saccharomyces lactis* 19-ның №4 нұсқасы

Сурет 5 - Консорциумға кіретін сүт қышқылы бактериялар мен лактозаны ашытатын ашытқы штамдарының таңдап алынған нұсқаларындағы титрленетін қышқылдық көрсеткіштері

Консорциумға кіретін сүт қышқылы бактерияларының штамдарының нұсқаларында титрленетін қышқылдығы 70-85°Т аралығында болады, бұл - орташа белсенділік болып саналады, ал оның параметрлері 90 °Т бастап 110°Т- дейін жоғары болды. Айта кету керек, *Saccharomyces lactis* 19 штаммы 200-240°Т титрленетін қышқылдықты құрайтын таңдап алынған №4 нұсқада, салыстырмалы түрде жоғары қышқыл түзу белсенділігін көрсетті. Титрленетін қышқылдығы 20-60°Т аралығында болатын коллекциялық сүт қышқылы бактериялары белсенді емес болып саналады.

Нәтижелерді қорытындылай келе, таңдап алынған бес культура нұсқаларының ішінде *Lactococcus lactis* 8 және *Streptococcus thermophilus* К-2 сүт қышқылының перспективалы өндірушілері болып табылады деген қорытынды жасауға болады. Олар басқа зерттелген штамдармен салыстырғанда жоғары қышқыл түзу белсенділігін көрсетті. Консорциумға кіретін сүтқышқылы бактериялары мен лактозаны ашытатын ашытқылар штамдарының нұсқаларын іріктеу - ұю ұзақтығы және қышқыл түзу белсенділігі сияқты параметрлер бойынша жүргізілді және болашақта оларды пробиотиктер ретінде пайдалануға болады.

Эксперименттік жұмыстар нәтижесінде алынған мәліметтер сүт қышқылы бактерияларының коллекциялық штамдарымен салыстырғанда консорциумға кіретін сүт қышқылы бактериялары мен лактозаны ашытатын ашытқылардың жақсы қышқыл түзетін қабілетін көрсетеді.

Әдебиеттер:

- 1 Гриднева Е.Е., Калиакпарова Г.Ш., Падалко И.У. Проблемы и перспективы развития рынка хлеба и хлебобулочных изделий в Республике Казахстан // *Проблемы агрорынка*, 2018, №1, 112-119.
- 2 Datta R. et al. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivative// *FEMS Microbiology Reviews*. 1995. Vol.16. 221-231.
- 3 Тренина М.А., Лысенко А.М., Ахвередян В.З., Мchedlishvili Е.Б. Изучение видовой вариабельности бактерий *Lactococcus lactis* по признаку адаптации к высокой кислотности среды.// *Микробиология*. 2006. Т.75. №1. 118-126.
- 4 Duwat P., Cesselin B., Souris S., Gruss A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival// *J. Food Microbiol.* 2000. Vol.55. 83-86.

5 Sjöberg A., Persson I., Quednau M., Hahn-Hagerdal B. The influence of limited and non-limited growth conditions on glucose and maltose metabolism in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 1995. Vol. 42. №6. 931-938.

6 Sheh Punia Bangar, Shweta Suri, Monica Trif, Fatih Ozogul. Organic acid production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food bioscience*, Volume 46, 2022. 101615/doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615.

7 Ганина В.И. Стабильные закваски - качественные и безопасные молочные продукты // *Молочная промышленность*. 1999. №8. 25-27.

8 Katarzyna Garbacz. Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Seminar in Cancer biology available online* 4.2022./doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.013.

9 Куксова Е.В. Разработка технологии комплексных пищевых добавок с использованием кислотообразующих бактерий: Автореф.... дис. канд. техн. наук. М. 2008. 27.

10 Warminska-Radyko I., Olszewska M., Mikiś-Krajnik M. Effect of temperature and sodium chloride on growth and metabolism of *Lactococcus* strains in long-term incubation of milk // *Milchwissenschaft-Milk Science International*. 2010. Vol. 65. 32-35.

11 Банникова Л. А. *Микробиологические основы молочного производства*. Москва, 1975.

12 Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. М.: Агро-промиздат, 1987. 400.

13 Штеффен С. Конфигурация молочной кислоты, образуемой различными штаммами молочнокислых бактерий, как функция условий культивирования / С. Штеффен, Б. Ник, Б. Х. Блан // *Межд. Конгресс по молочному делу. М., Пищевая промышленность*, 1978. 156-157.

14 Пухан З. Состав молочнокислой флоры и конфигурация молочной кислоты в йогурте / Пухан, О. Флуэлер, М. Банхеджи // 19 Межд. конгресс по молочному делу. М.: *Пищевая пром-сть*, 1978. – 192.

15 Печуркин Н.С. *Популяционная микробиология*. Новосибирск: Наука. 1978.

16 Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. *Популяционные аспекты биотехнологии*. Новосибирск: Наука (Сиб. отд.). 1991.

17 Лиходед В.Г., Бондаренко В.М. Антиэндоксинный иммунитет в регуляции численности эшерихиозной микрофлоры кишечника. *Медицина*, 2007. 216.

18 Аркадьева З.А. и др. *Промышленная микробиология*. М., 1989. 686.

19 Варфаломеев С.Д. Кинетические закономерности развития микробных популяций // *Современные проблемы биокинетики*. М., 1987. 6-77.

20 Миневич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. М., 2005. 353.

21 Проскуряков М.Т. *Биохимия*. Краснодар, 2007. 199.

22 Гуревич Ю.Л. Устойчивость и регуляция в микробных популяциях. Новосибирск, 1984. 98.

Г.Т. ДЖАКИБАЕВА^{1*}, А.И. БАЙДАЛИНОВ¹, О.Н. ШЕМШУРА¹, Э.О. ИЗМАЙЛОВА²,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹

¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, азахстан

² Институт химии и фитотехнологий, Бишкек, Кыргызстан

*e-mail: j.gulnar60@mail.ru

АКТИВНОСТЬ КОЛЛЕКЦИОННЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ЛАКТОЗОСБРАЖИВАЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ВХОДЯЩИХ В КОНСОРЦИУМ

Аннотация

В статье представлены экспериментальные данные по жизнеспособности и кислотообразующей активности молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей, входящих в консорциум, а также молочнокислых бактерий, хранящихся в коллекции микроорганизмов НПП микробиологии и вирусологии под минеральном маслом.

Полученные данные свидетельствуют о высокой кислотообразующей способности штаммов молочнокислых бактерий и лактозосбраживающих дрожжей, входящих в консорциум, по сравнению с коллекционными штаммами молочнокислых бактерий.

Ключевые слова: кислотообразующая активность, молочнокислые бактерии, лактозосбраживающие дрожжи, жизнеспособность, популяционная изменчивость.
IRSTI: 34.27.17

G.T. DZHAKIBAYEVA^{1*}, A.I. BAYDALINOV¹, O.N. SHEMSHURA¹, E.O. IZMAILOVA¹, G.B. BAUMAHANOVA¹

¹Research and Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Institute of chemistry and phytotechnology, Kirgystan, Bishkek

*e-mail: j.gulnar60@mail.ru

ACTIVITY OF COLLECTION LACTIC ACID BACTERIA AND LACTOSE-FERMENTING YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA INCLUDED IN THE CONSORTIUM

doi: 1053729/MV-AS.2022.04.09

Abstract

The article presents experimental data on the viability and acid-forming activity of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeasts included in the consortium, as well as lactic acid bacteria stored in the collection of microorganisms of the NPC of Microbiology and Virology in mineral oil. The data obtained indicate a good acid-forming ability of the strains of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeasts included in the consortium, compared with the collection strains of lactic acid bacteria.

Keywords: acid-forming activity, lactic acid bacteria, lactose-fermenting yeast, viability, population variability.

Lactic acid is widely used in the food industry for the production of beverages, marmalade, in canning processes [1]. It is also used in feed production and in heavy industry. Lactic acid polymerizes well. The demand for it has grown due to the possibility of its use as a feedstock for biodegradable polymers, oxygenated substances, plant growth regulators and special-purpose chemical products [2]. Microbiological synthesis of lactic acid is much more cost-effective than chemical synthesis [3-6]. Lactic acid producers homofermentative lactic acid bacteria are used as part of probiotics for the treatment of humans and young animals [7, 8].

An important area of work on the optimization of lactic acid production is the study of the biological properties of lactic acid fermentation producers, selection of active homofermentative lactic acid bacteria, optimization of biosynthesis process control parameters. It is also important to study and apply optimal conditions for the growth of selected cultures of microorganisms and the effectiveness of the acid formation process [9]. By means of such factors as nitrogen and carbon sources, pH, temperature, cultivation method, affecting the titer of the culture-producer of lactic acid and its productivity [10].

As L. A. Bannikova notes in her work, the properties of individual strains of lactic acid bacteria, as well as their combinations, are evaluated by a number of indicators, which primarily include: acid-forming activity - the rate and depth of lactose cleavage with the formation of a certain lactic acid isomer [11, 12]. S. Steffen et al. studied the influence of various factors on the configuration of lactic acid formed by different strains of lactic acid bacteria. As it turned out, changes in the time, incubation temperature, pH and composition of the nutrient medium did not significantly affect the configuration of lactic acid. Most of the studied strains of lactococci produced - P-lactate, strains of *L.bulgaricus* and *L.lactis* - exclusively R-lactate, and *L. helveticus* and *L.acidophilus* - both isomers in the same amounts [13]. The form of lactic acid formed is characteristic of a certain type of lactobacilli [14]. The acid-forming activity of lactic acid bacteria is due to their high growth rate in milk and enzymatic activity. Certain types of lactobacilli, which have a low growth rate in milk and, accordingly, a weak acid-forming ability, need additional growth factors (yeast autolysate, corn extract, etc.) [15, 16]. The activity of acid formation is a

normalized indicator of the specific activity of lactose-containing probiotics and, accordingly, a criterion for the selection of lactobacillus strains in the development of new bacterial preparations [17].

Materials and methods

Lactic acid microorganisms were used in the work (*Lactococcus lactis* K-1, *Lactobacterium bulgaricus* K-3, *Streptococcus thermophilus* K-2, *Streptococcus lactis* 6, *Lactococcus lactis* 8) and lactose-fermenting yeasts (*Saccharomyces lactis* 19 and *Saccharomyces lactis* 14c) included in the consortium, which are isolated from fermented dairy products of Kaskelensky district of Almaty region.

MRS medium was used for the cultivation of lactic acid microorganisms [18]. The source of carbon in the medium was glucose, the source of nitrogen was yeast extract. The number of viable cells (CFU/ml or titer) was determined by 10-fold dilution of the sample and seeding on agarized MRS and Saburo media [19, 20].

Determination of the energy of acid formation. 1 loop of the studied strain was inserted into a test tube with 10 ml of sterile skimmed milk and thermostated at an optimal temperature (30-37 °C) for 16 hours (when determining the energy of acid formation), after which the titrated acidity was determined [21].

Determination of titrated acidity. 20 ml of distilled H₂O and 2 drops of 1% phenolphthalein were added to 10 ml of the sample. The samples were then titrated with 0.1 NaOH until a faint pink staining appeared. The volume (ml) of NaOH used for titration and multiplied by 10 was an indicator of titrated acidity expressed in Turner degrees (°T) [22].

Results and discussion

The viability of ICD and lactose-fermenting yeast after various storage periods was evaluated by surface sieving from dilutions 10^7 - 10^9 in 3 Petri dishes (with the calculation of the average value) on agarized media MRS and Saburo counting colonies after incubation at 30 ± 1 °C and 37 ± 1 °C for 48 h. The percentage of survival of microorganisms was found in relation to the logarithm of the average value of the number of colony-forming units (CFU) after storage under a layer of mineral oil. The data were processed according to the Student's t-criterion (errors are not given, since the conclusions are based on obviously significant differences).

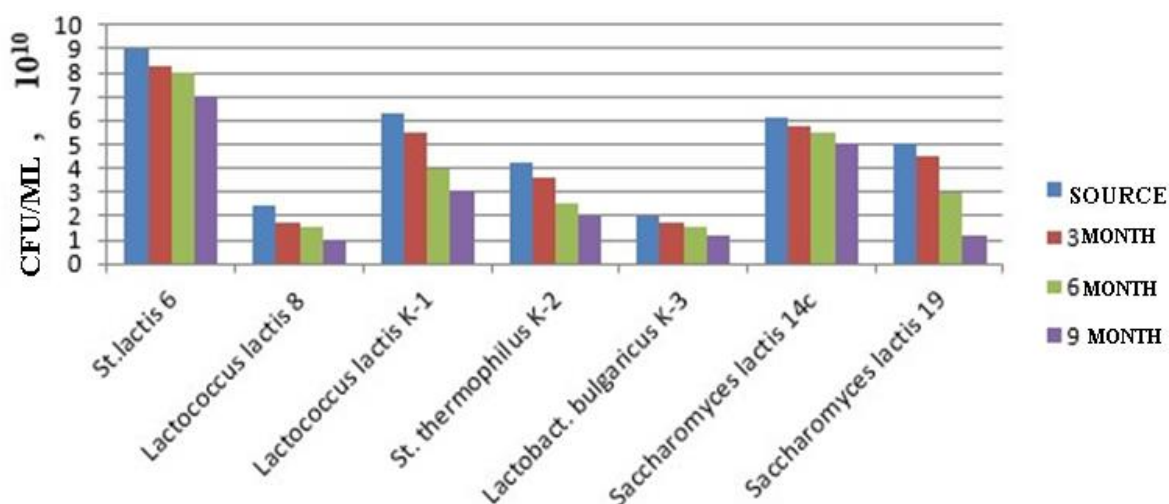


Figure 1 – Comparative diagram of changes in the number of cells during separate cultivation of lactic acid microorganisms and lactose-fermenting yeasts included in the consortium after storage under a layer of mineral oil

It was found (Figure 1) that the viability of ICD and lactose-fermenting yeast stored under a layer of mineral oil decreased to 10-23% after 9 months. Thus, the survival rate of two strains of

Lactococcus lactis 8 and *Lactobacterium bulgaricus* K-3 by the end of the shelf life under a layer of mineral oil decreased to 42-53.5%. The most resistant strain was *Streptococcus lactis* 6, the maximum survival rate of which after 9 months of storage was 81.9%.

The formation of organic acids (lactic) by lactobacilli is considered one of the mechanisms of antagonistic activity in relation to conditionally pathogenic microorganisms. In this regard, the study of the dynamics of acid formation is considered as an important stage in the characterization of the biological properties of lactobacilli. We determined the dynamics of changes in titrated acidity during the cultivation of lactobacilli in sterile skim milk.

Table 1 - Acid-forming activity of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeasts included in the consortium after storage under a layer of mineral oil, depending on the duration of coagulation

Strains of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeast	Duration of coagulation when applying 3% starter culture, hour	Titrated acidity, deg			
		Source	3 month	6 month	9 month
1	2	3	4	5	6
<i>Streptococcus lactis</i> 6	16	75	70	65	55
<i>Lactococcus lactis</i> 8	16	97	85	60	52
<i>Lactococcus lactis</i> K-1	16	80	70	60	55
<i>Streptococcus thermophilus</i> K-2	16	100	85	75	63
<i>Lactobacterium bulgaricus</i> K-3	16	95	80	75	65
<i>Saccharomyces lactis</i> 14c	16	200	195	180	170
<i>Saccharomyces lactis</i> 19	16	210	200	190	180

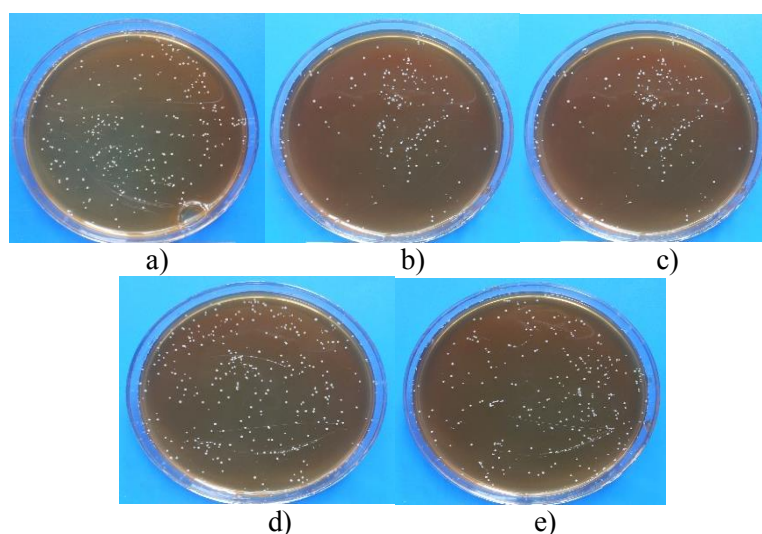
It was found that the most active acid producers were strains of lactose-fermenting yeast *Saccharomyces lactis* 14c - 200°T and *Saccharomyces lactis* 19 – 210°T, moderate acid-forming strains of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* 8 - 97°T, *Streptococcus thermophilus* K-2 - 100°T, *Lactobacterium bulgaricus* K-3 - 95 °T, weak acid-forming *Streptococcus lactis* 6 - 75 °T, *Lactococcus lactis* K-1 -80°T. With regard to changes in the acid-forming activity of ICD and lactose-fermenting yeast during storage under a layer of mineral oil, it was found (Table 1) that within 9 months this indicator decreased by no more than 5-18%. The exception was the strain *Lactococcus lactis* 8, whose activity decreased by 45%.

Table 2 - Acid-forming activity of collection lactic acid bacteria

Strains of collectible lactic acid bacteria	Duration of coagulation when applying 3% starter culture, hour	Acid formation in milk, °T	Growth temperature, °C
1	2	3	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	16	22	35
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	16	35	35
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53H	16	55	35
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27W	16	42	35
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18g	16	45	35
<i>Lactobacillus casei</i> 139	16	60	35
<i>Lactobacillus casei</i> 173a	16	30	35
<i>Lactobacillus salivarius</i> 8g	16	50	35
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	16	35	35
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	16	20	35

It was revealed that the most active acid producers are strains of collectible lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* 139 - 60°T, *Lactobacillus plantarum* 53H - 55°T and *Lactobacillus salivarius* 8g - 50°T, *Lactobacillus curvatus* strains 18g - 45°T and *Lactobacillus acidophilus* 27W - 42°T were moderate acid-forming agents, *Lactobacillus plantarum* 2 - 22°T were weak acid-forming agents and *Lactobacillus cellobiosus* 20 - 20°T (Table 2).

The study of population variability of consortium No.1 (*Lactococcus lactis* K-1, *Streptococcus thermophilus* K-2, *Lactobacterium bulgaricus* K-3 and lactose-fermenting yeast *Saccharomyces lactis* 19) and consortium № 2 (*Streptococcus lactis* 6, *Lactococcus lactis* 8, *Saccharomyces lactis* 14c), strains lactic acid bacteria showed heterogeneity. Figure 2 shows that on the surface of a dense nutrient medium, lactic acid bacteria form similar colonies of about 2-4 microns in diameter, convex, round, smooth, white.



Note: a) *Lactococcus lactis* K-1, b) *Streptococcus thermophilus* K-2, c) *Lactobacterium bulgaricus* K-3, d) *Streptococcus lactis* 6, e) *Lactococcus lactis* 8

Figure 2 - Population variability of lactic acid bacteria

Figure 3 shows the morphology of lactobacillus yeast. On the surface of a dense nutrient medium, lactose-fermenting yeasts form colonies about 6-8 microns in diameter, convex, round, smooth, white.

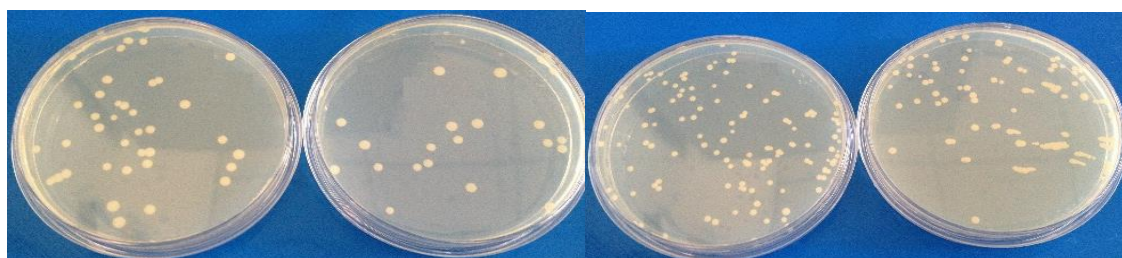


Figure 3 - Population variability of lactose-fermenting yeast

To select the most promising strain-producer of lactic acid, the acid-forming ability of 5 cultures of lactic acid bacteria and 2 cultures of lactose-fermenting yeast was studied. 5 variants of a colony of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeast were selected.

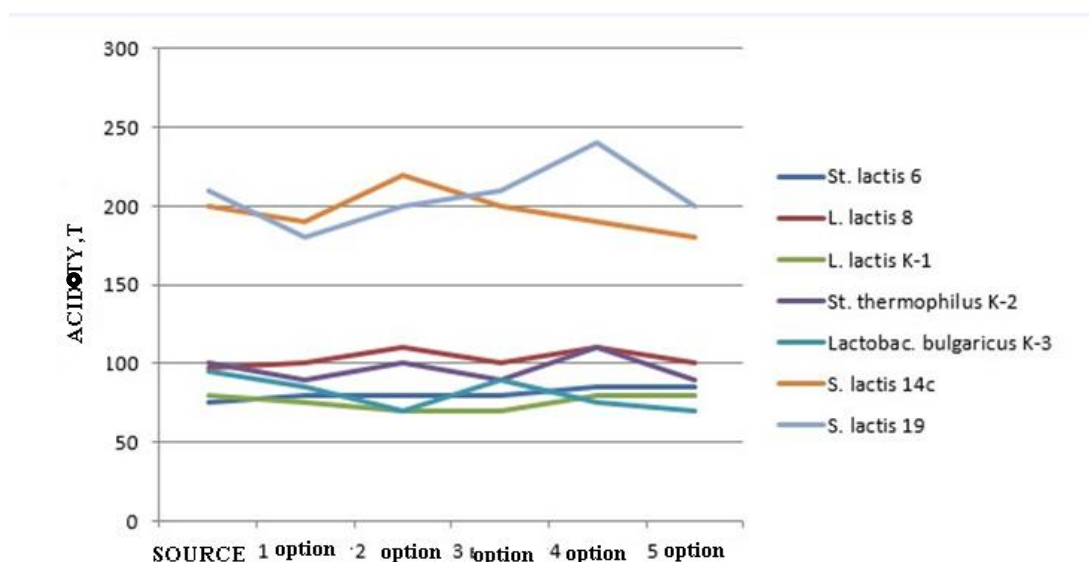
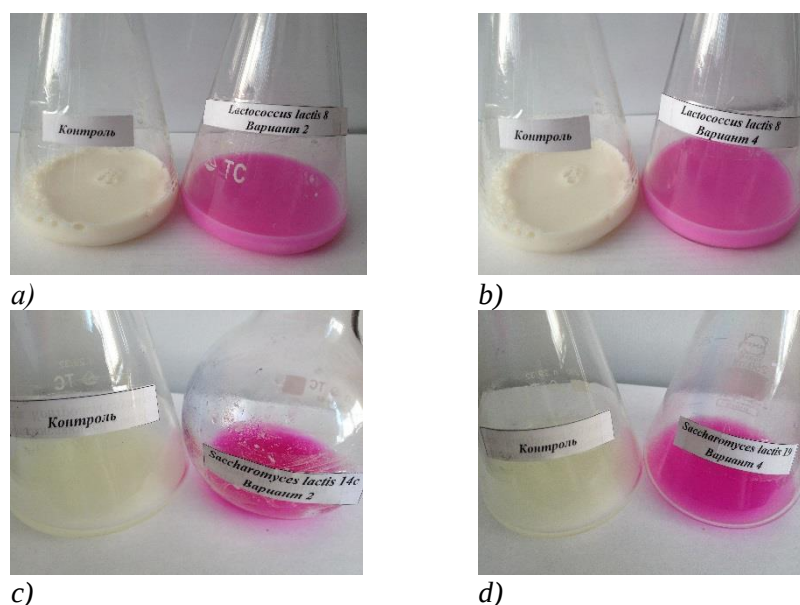


Figure 4 – Determination of the dynamics of acidity changes in selected variants of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeasts included in the consortium

Of the selected 5 variants of lactic acid bacteria strains *Lactococcus lactis* 8 and *Streptococcus thermophilus* K-2, the most active variants are №2 and №4. Moderate acid-forming variants №4 and №5 in strains *Streptococcus lactis* 6, *Lactococcus lactis* K-1 and variants №1 and №3 in the strain *Lactobacterium bulgaricus* K-3. The active acid-forming ability was manifested in variants №2 and №4 in lactose-fermenting yeasts *Saccharomyces lactis* 14c and *Saccharomyces lactis* 19 (Figure 4).



Note: a) №2 variant *Lactococcus lactis* 8; b) №4 variant *Lactococcus lactis* 8; c) №2 variant *Saccharomyces lactis* 14c; d) №4 variant *Saccharomyces lactis* 19.

Figure 5 - Indicators of titrated acidity in selected variants of strains of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeast included in the consortium

In variants of strains of lactic acid bacteria included in the consortium, the titrated acidity of which ranges from 70-85 °T, are considered to be moderately active, and those with this parameter over 90-110 °T highly active. It should be noted that the strain *Saccharomyces lactis*

19 showed a relatively high acid-forming activity in the selected variant №4, the titrated acidity of which ranges from 200-240 °T. Collection lactic acid bacteria, the titrated acidity of which ranges from 20-60 °T, are considered inactive.

Summarizing the results obtained by us, we can conclude that out of the selected five culture variants *Lactococcus lactis* 8 and *Streptococcus thermophilus* K-2 are promising producers of lactic acid. They showed high acid-forming activity, in comparison with other studied strains. The selection of variants of strains of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeast included in the consortium was carried out according to parameters such as the duration of coagulation and acid-forming activity and in the future they can be used as probiotics.

The data obtained as a result of experimental work indicate a good acid-forming ability of the strains of lactic acid bacteria and lactose-fermenting yeasts included in the consortium, compared with the collection strains of lactic acid bacteria.

References:

- 1 Gridneva E.E., Kaliakparova G.SH., Padalko I.U. Problemy i perspektivy razvitiya rynka hleba i hlebobulochnykh izdelij v Respublike Kazahstan // *Problemy agrorynka*, 2018, №1, 112-119.
- 2 Datta R. et al. Technological and economic potential of poly(lactic acid) fnd lactic acid derivative// *FEMS Microbiology Revivs*.1995. Vol.16.221-231.
- 3 Trenina M.A., Lysenko A.M., Ahveredyan V.Z., Mchedlishvili E.B. Izuchenie vidovoj variabel'nosti bakterij *Lactococcus lactis* po priznaku adaptacii k vysokoj kislotnosti sredy.// *Mikrobiologiya*. 2006. T.75. №1.118-126.
- 4 Duwat P., Cesselin B., Souris S., Gruss A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival// *J.Food Microbiol*.2000. Vol.55.83-86.
- 5 Sjoberg A., Persson I., Quednau M., Hahn-Hagerdal B. The influence of limited and non-limited growth conditions on glucose and maltose metabolism in *Lactococcus lactis* ssp.lactis strains// *Appl.Microbiol.fnd Biotechnol*.1995. Vol.42. №6.931-938.
- 6 Sheh Punia Bangar, Shweta Suri, Monica Trif, Fatih Ozogul. Organic acid production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food bioscience*, Volume 46, 2022.101615/doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615.
- 7 Ganina V.I. Stabil'nye zakvaski - kachestvennye i bezopasnye molochnye produkty// *Molochnaya promyshlennost'*. 1999. №8. 25-27.
- 8 Katarzyna Garbacz. Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Seminar in Cancer biology available online* 4.2022./doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.013.
- 9 Kuksova E.V. *Razrabotka tekhnologii kompleksnyh pishchevyh dobavok s ispol'zovaniem kislotoobrazuyushchih bakterij: Avtoref.... dis. kand. tekhn. nauk. M.* 2008. 27.
- 10 Warminska-Radyko I., Olszewska M., Miks-Krajnik M. Effect of temperature and sodium chloride on growth and metabolism of *Lactococcus* strains in long-term incubation of milk // *Milchwissenschaft-Milk Science International*.2010. Vol.65.32-35.
- 11 Bannikova L. A. *Mikrobiologicheskie osnovy molochnogo proizvodstva*. Moskva, 1975.
- 12 L. A. Bannikova, N. S. Koroleva, V. F. Semenihina M.: *Agro-promizdat*, 1987.400.
- 13 SHteffen S. Konfiguraciya molochnoj kisloty, obrazuemoj razlichnymi shtammami molochnokislykh bakterij, kak funkciya uslovij kultivirovaniya / S. SHteffen, B. Nik, B. X. Blan // *Mezhd. Kongress po molochnomu delu. M., Pishchevaya promyshlennost'*, 1978.156-157.
- 14 Puhan 3. Sostav molochnokisloj flory i konfiguraciya molochnoj kisloty v jogurte / 3. Puhan, O. Flueller, M. Banhedzhi // *19 Mezhd. kongress po molochnomu delu. M.: Pishchevaya prom-st'*, 1978. 192.
- 15 Pechurkin N.S. *Populyacionnaya mikrobiologiya*. Novosibirsk: Nauka. 1978.
- 16 Pechurkin N.S., Bril'kov A.V., Marchenkova T.V. *Populyacionnye aspekty biotekhnologii*. Novosibirsk: Nauka (Sib. otd.). 1991.
- 17 Lihoded V.G., Bondarenko V.M. Antiendotoksinovyy immunitet v regulyacii chislennosti esherihioznoj mikroflory kishchnika. *Medicina*, 2007.216.
- 18 Arkad'eva Z.A. i dr. *Promyshlennaya mikrobiologiya*. M.,1989. 686.
- 19 Varfalomeev S.D. Kineticheskie zakonomernosti razvitiya mikrobnih populyacij // *Sovremennye problemy biokinetiki*. M.,1987. 6-77.

- 20 Minevich I.G. Material'no-energeticheskij balans i kinetika rosta mikroorganizmov.M., 2005.
353.
- 21 Proskuryakov M.T.*Biohimiya*. Krasnodar,2007.199.
- 22 Gurevich YU.L. Ustojchivost' i regulyaciya v mikrobnih populyacijah.Novosibirsk, 1984.98.

МРНТИ: 34.27.39

Э.Р. ФАЙЗУЛИНА^{1*}, Л. Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА¹, И. Э. СМИРНОВА¹,
З. АЛЕКСИЕВА²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы,
Казахстан

²Болгарская академия наук, София, Болгария
*e-mail: elmira_f@mail.ru

ВЛИЯНИЕ СОЛЁНОСТИ И pH СРЕДЫ НА ДЕГРАДАЦИЮ НЕФТИ КОНСОРЦИУМАМИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.10

Аннотация

Изучено влияние солёности и pH среды на деградацию нефти тремя консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов. Установлено, что исследуемые консорциумы устойчивы к высокому содержанию NaCl в среде и обладают высокой нефтеокисляющей активностью. Так, за 14 суток культивирования степень утилизации нефти с 2% NaCl в среде составила 50,7-66,8%, с 5% – 65,5-72,8%, с 10% – 69,0-73,5%.

Показана высокая деструкционная способность исследуемых консорциумов при разных значениях pH среды. Наибольшую активность они проявили в щелочной среде (pH 8 и 9), степень деструкции нефти при этих значениях составила свыше 80%. В кислой среде (pH 5 и 6) было утилизировано 57,1-67,6% и 51,2-56,9% нефти, при pH 7 – 58,7-62,9%.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, нефтеокисляющие микроорганизмы, консорциум, биоремедиация, солёность, pH среды.

Рост и развитие промышленности в настоящее время привели к интенсивному загрязнению окружающей среды токсичными веществами. Среди таких загрязнителей одно из первых мест принадлежит нефти и нефтепродуктам. На всех стадиях, начиная от разведки и добычи нефти, и кончая использованием нефтепродуктов, в той или иной мере происходят выбросы продуктов в окружающую среду, что приводит к ухудшению экологической ситуации и к отрицательному воздействию на здоровье людей [1, 2].

При попадании в почву нефть и нефтепродукты оказывают угнетающее воздействие на растительность, подавляют почвенную микрофлору. В результате снижается плодородие почв, что делает их непригодными для сельскохозяйственного использования. При этом естественное восстановление нефтезагрязнённых почв может протекать десятилетиями [3]. При использовании только механических, физических и химических методов ремедиации не обеспечивается необходимый уровень очистки окружающей среды. Такие методы могут приводить к вторичному загрязнению и нарушению естественных ландшафтов [4, 5].

Растущая потребность в восстановлении загрязнённых участков привела к разработке технологий, при которых основное внимание уделяется биологической детоксикации и уничтожению органических загрязнителей. Биологическая очистка является альтернативным методом удаления загрязняющих веществ, поскольку не оказывает вредного воздействия на окружающую среду [6]. Биоремедиация входит в число этих технологий. При её использовании удаляются или обезвреживаются различные загрязнители [7]. Метод биоремедиации основан на применении активных микробных штаммов, проявляющих способность к деградации углеводородов нефти. Углеводородоокисляющие микроорганизмы в силу своей полифункциональности, ферментативной активности и высокой скорости размножения способны использовать

углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода и доводить процесс трансформации органического вещества до полной минерализации. Конечными продуктами такой биотрансформации являются углекислый газ, вода и другие экологически нейтральные соединения. Именно поэтому биоремедиация почв, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами, активными штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов предлагается в качестве наиболее перспективного метода борьбы с этим загрязнением [8, 9].

Около 60% мировых запасов нефти находится на территориях стран с жарким климатом, где специфика природных, в частности, температурных условий вынуждает более тщательно подходить к выбору метода ремедиации загрязнённых земель [10, 11]. Температура является одним из ключевых факторов, влияющим на физические свойства и химический состав нефтяных углеводородов, а, следовательно, и на их биodeградацию. В зависимости от неё могут претерпевать сезонные изменения бактериальная активность и, соответственно, скорость биodeградации нефти [12, 13]. Также на микробиологические процессы оказывают влияние солёность и pH среды. Цинь с соавторами предположили, что солёность оказывает большое влияние на процессы биоремедиации и биоразложения, а также влияет на рост и разнообразие микробов [14]. Солёность оказывает негативное влияние на активность ряда ключевых ферментов, усложняющихся в процессе деградации углеводородов [15]. Кислотность почвы также играет важную роль: в природных условиях микроорганизмы-биодеструкторы обычно активны в узкой области pH (нейтральные, или близкие к нейтральным значениям) [16].

Загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами является актуальной проблемой и для Казахстана. Известно, что в нефтедобывающих регионах Казахстана климат резко-континентальный, характеризующийся резкими сезонными и суточными перепадами температур. Одной из главных проблем ремедиации территорий в условиях жаркого климата является тот факт, что высокие температуры снижают вязкость нефти и, таким образом, ускоряют ее диффузию вглубь грунта. В то же время повышенные среднесуточные температуры являются причиной быстрого испарения воды из грунта, что приводит к его засолению [17].

В Западном Казахстане на нефтепромыслах отмечены очаги нефтехимического загрязнения, засоления сточными пластовыми водами, отличающимися высокой минерализацией вод с преобладанием в солевом комплексе хлорида натрия [18]. Кроме того, разливы сырой нефти вызывают подщелачивание различной степени почвенного раствора, что находится в зависимости от концентрации нефти [19].

Целью исследования было изучение способности консорциумов нефтеокисляющих микроорганизмов окислять углеводороды нефти при различных концентрациях NaCl и pH среды.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований были отобранные активные консорциумы нефтеокисляющих бактерий, состоящие из штаммов:

9 – *Rhodococcus fascians* K3, *Dietzia* sp. 84Y, *Pusillimonas* sp. 1/8ан;

18 – *Dietzia* sp.34, *Dietzia* sp.84Y, *Pusillimonas* sp. 1/8ан;

19 – *Dietzia* sp.34, *Dietzia* sp.84Y, *Rhodococcus* sp. 1Д/1.

Питательные среды. Модифицированная минеральная среда ВД следующего состава, г/л: NH_4NO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, KH_2PO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,2, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, FeCl_3 – следы, NaCl – 10,0, pH = 7,0-7,2.

Нефть. Сырая нефть месторождения Доссор Атырауской области.

Изучение деструкционной способности отобранных консорциумов при разных значениях солёности питательной среды проводили в колбах Эрлеймейера с минеральной средой ВД, в которую добавляли 2, 5 и 10% NaCl. Нефть вносили из расчета

2% по объему. Колбы инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C в течение 14 суток. Количественное потребление нефти определяли гравиметрическим методом.

Деструкционную способность отобранных консорциумов при разных значениях pH среды (5-9) изучали в жидкой минеральной среде ВД. pH 5 и 6 устанавливали подкислением среды серной кислотой, pH 8 и 9 – подщелачиванием 10%-ным раствором NaOH. Нефть вносили из расчета 2% по объему. Колбы инкубировали в термостатируемом шейкере при 30°C в течение 14 суток. Количественное потребление нефти определяли гравиметрическим методом.

Все эксперименты ставились в 3-кратной повторности.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Оценку статистической значимости различий средних величин проводили по стандартной методике [20]. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты исследований и обсуждение

Известно, что почва на нефтепромыслах Казахстана в разной степени засолена, при этом преобладает хлоридное засоление. В связи с этим была изучена деструкционная способность отобранных консорциумов при разных значениях солёности среды (2%, 5%, 10%).

Результаты исследования показали, что отобранные консорциумы выдерживали концентрацию NaCl до 10% (таблица 1). При 2% NaCl наибольшую нефтеокисляющую активность показал консорциум 19, степень деструкции нефти при его культивировании составила 66,8%. Наименьшая активность в этих условиях была у консорциума 9, который утилизировал 50,7% нефти.

При 5% содержании NaCl в среде консорциумы 18 и 19 деградировали нефть примерно на одном уровне. Через 14 суток культивирования ее содержание снизилось на 71,2% и 72,8%, соответственно. Консорциум 9 также был менее активным, степень деструкции нефти под его воздействием составила 65,5%.

При 10% содержании NaCl в среде наибольшая нефтеокисляющая активность отмечена у консорциума 9, который утилизировал 73,5% нефти. Менее активным был консорциум 19.

Таблица 1 – Деструкция нефти м. Доссор активными консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов при различной концентрации NaCl в среде

Консорциум	Степень деструкции нефти, %		
	2% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
9 (<i>Rhodococcus fascians</i> K3, <i>Dietzia</i> sp. 84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8ан)	50,7	65,5	73,5
18 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8ан)	64,3	71,2	71,9
19 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Rhodococcus</i> sp. 1Д/1)	66,8	72,8	69,0
контроль	20,6	21,0	19,1

В ряде работ показано, что наличие NaCl в среде ослабляло процесс деструкции нефти и нефтепродуктов, предположительно, за счёт его ингибирующего действия на рост бактерий. Увеличение концентрации соли снижало и скорость биodeградации [15, 21]. В наших исследованиях установлено, что деструкционная способность изучаемых консорциумов, наоборот, повышалась с увеличением концентрации NaCl в среде. Так, наименьшая степень деструкции нефти отмечена при 2% содержании соли. Консорциум 9 утилизировал максимальное количество нефти при 10% NaCl. Степень деструкции нефти под воздействием

консорциума 18 при 5% и 10% содержании соли отличалась незначительно – 71,2 и 71,9%, соответственно. У консорциума 19 отмечалось небольшое снижение активности – с 72,8% до 69,0%. Более высокая скорость биоразложения нефти консорциумами при повышенной концентрации NaCl, возможно, связана с тем, что микроорганизмы, входящие в их состав, адаптированы к этим условиям, так как были выделены из нефтезагрязненных почв Атырауской области, характеризующихся высоким уровнем засоления.

pH среды также является одним из факторов, влияющих на биоремедиацию нефтезагрязненных экосистем. Кислотность окружающей среды влияет на такие процессы, как транспорт через клеточную мембрану и баланс каталитических реакций, а также - на активность ферментов. Уровень pH может сильно варьироваться, и его необходимо учитывать при совершенствовании методов биологической очистки [6]. В связи с этим, была изучена нефтеокисляющая активность отобранных консорциумов при росте в жидкой минеральной среде с нефтью при разных значениях кислотности (таблица 2).

Таблица 2 – Деструкция нефти м. Доссор активными консорциумами термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов при разных значениях pH среды

Консорциум	Степень деструкции нефти, %				
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
9	63,2	51,2	58,7	84,5	87,9
18	67,6	53,4	60,3	92,4	81,3
19	57,1	56,9	62,9	94,4	82,3
контроль	15,7	16,3	15,9	16,2	16,3

Из данных таблицы 2 видно, что все консорциумы показали наименьшую активность при pH 6, а наибольшую - при pH 8 и 9.

В кислой среде (pH 5) лучше всего деградировал нефть консорциум 18. При pH 6, 7 и 8 наиболее эффективным был консорциум 19, а при pH 9 – консорциум 9.

Консорциум 19 при pH 5 и 6 утилизировал нефть на одном уровне – 57,1% и 56,9%, соответственно. С увеличением значений pH возрастала и деструкционная активность, достигая максимума при pH 8 (94,4%). При pH 9 степень деградации нефти этим консорциумом снизилась, но оставалась на высоком уровне – свыше 80%.

Консорциумы 9 и 18 показали наименьшую активность в слабокислой и нейтральной среде, при pH 5 она была несколько выше. Наибольшее количество нефти консорциум 18 утилизировал при pH 8 – 92,4%, а при pH 9 – на 11% меньше. Степень деградации нефти под воздействием консорциума 9, наоборот, увеличивалась с повышением pH от 8 до 9.

Заключение

Таким образом, исследуемые консорциумы показали устойчивость к высокому содержанию соли и высокую нефтеокисляющую активность. При содержании в питательной среде NaCl 2% степень утилизации нефти за 14 суток культивирования составила 50,7-66,8%, при 5% – 65,5-72,8%, при 10% – 69,0-73,5%. Естественная убыль нефти составила 19,1-21,0%.

Показана способность к биоразложению нефти отобранными активными консорциумами при разных значениях pH среды. Наибольшую активность консорциумы показали в щелочной среде (pH 8 и 9), степень деструкции нефти при этих значениях составила 84,5-94,4% и 81,3-87,9%, соответственно. В кислой среде (pH 5 и 6) было утилизировано 57,1-67,6% и 51,2-56,9% нефти, при pH 7 – 58,7-62,9%. При этом естественная убыль нефти составила 19,0-21,3%.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант AP09260140).

Литература:

- 1 Karlapudi A. P., Venkateswarulu T.C., Tammineedi J., Kanumuri L. Bharath K. R., Dirisala V. R., Kodali V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review // *Petroleum*. – 2018. – Vol. 4(3). – С. 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- 2 Khanpour-Alikelayeh E., Partovinia A., Talebi A., Kermanian H. Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2020. – Vol. 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103>
- 3 Карасева Э.В. Биоремедиация черноземной почвы, загрязненной нефтью // *Биотехнология*. – 2009. – № 2. – С. 122-129.
- 4 Кирий О.А., Колесников С.И., Зинчук А.Н. Применение бактериального препарата «Дестройл» для ликвидации загрязнений нефтепродуктами пресных водоемов // *Политематический сетевой электронный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ)*. – 2012. – №09 (83). – URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/46.pdf>
- 5 Колесников С.И., Гайворонский В.Г., Ротина Е.Н., Жаркова М.Г., Денисова Т.В., Казеев К.Ш. Результаты экспериментального изучения загрязнения бурых почв мазутом // *Геоэкология*. – 2011. – № 2. – С. 183-187.
- 6 Adnan B. Al-Hawash, Maytham A. Dragh, Shue Li, Ahmad Alhujaily Hayder A. Abbood, Xiaoyu Zhang Fuying M. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment // *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. – 2018. – Vol. 44 (2). – P. 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- 7 Anastasios I. Zouboulis, Panagiotis A. Moussas, Savvina G. Psaltou Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation // *Encyclopedia of Environmental Health.-Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. – 2018. – P. 1037-1044. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00035-0>
- 8 Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – М.: Графикон, 2006. – 336 с.
- 9 Sunita J. Varjani Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 223. – P. 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- 10 Piyadasa H.T.N.I. Marine environment protection from offshore oil and gas: activities in Sri Lanka//*World Maritime University Dissertations*. – 2014. – 185 p. https://commons.wmu.se/all_dissertations/485/
- 11 Veerasingam S., Vethamony P., Mani Murali R., Babu, M.T. Sources, Vertical Fluxes and Accumulation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments from the Mandovi Estuary, West Coast of India // *Int. J. Environ. Res*. – 2015. – Vol. 9(1). – P. 179-186. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.887>
- 12 Boqun Liu, Meiting Ju, Jinpeng Liu, Wentao Wu, Xiaojing Li Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain // *Marine Pollution Bulletin*. – 2016. – Vol. 106, Iss. 1–2. – P. 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>
- 13 Myat Thwe Myint Aung, Qintong Li, Seiya Takahashi, and Motoo Utsumi Effect of Temperature on Hydrocarbon Bioremediation in Simulated Petroleum-Polluted Seawater Collected from Tokyo Bay // *Japanese Journal of Water Treatment Biology*. – 2018. – Vol.54 (3). – P. 95-104. <https://doi.org/10.2521/jswtb.54.9>
- 14 Qin X., Tang J., Li D., Zhang Q. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil // *Lett. Appl. Microbiol*. – 2012. – Vol. 55 (3). – P. 210-217. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03280.x>
- 15 Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani N. R. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium // *J. Adv. Res*. – 2017. – Vol. 8 (6). – P. 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- 16 Дёмин А.В., Костин М.В., Садчиков А.В. Применение продукта биогазовой установки как нефтеструктора при биоремедиации нефтезагрязненных земель // *Современные проблемы науки и образования*. – 2014. – № 4. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14002>
- 17 Делеган Я.А., Ветрова А.А., Чернявская М. И., Титок М.А., Филонов А. Е. Термотолерантные актиномицеты как агенты ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в условиях жаркого аридного климата // *Известия Тульского государственного университета Естественные науки*. – 2015. – Вып. 4. – С. 248–258.

18 Томина Т.К. Засоленность почв территории нефтяных месторождений Караарна и Восточная Кокарна // Почвоведение и агрохимия. – 2015. – №3. – С. 117-130.

19 Кенжегалиев А., Кулбатыров Д.К., Базарбекова М.М., Жунисканкызы К. Исследования и разработка рекомендации по восстановлению деградированной почвы нефтедобывающих месторождений. – Атырау, 2021. – 250 с.

20 Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

21 Dariush Minai-Tehrani, Ali Herfatmanesh, Forood Azari-Dehkordi, Saiid Minooi Effect of Salinity on Biodegradation of Aliphatic Fractions of Crude Oil in Soil // Pakistan Journal of Biological Sciences – 2006. – Vol. 9. – P. 1531-1535. URL: <https://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2006/1531-1535.pdf>

Э.Р. ФАЙЗУЛИНА^{1*}, Л. Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, С.А. АЙТКЕЛЬДИЕВА¹, И. Э. СМЕРНОВА¹,
З. АЛЕКСИЕВА²

¹Микробиология және вирусология ғылыми - өндірістік орталығы, Алматы, азақстан

²Болгария ғылым академиясы, София, Болгария

*e-mail: elmira_f@mail.ru

ТЕРМОТОЛЕРАНТТЫ МҰНАЙТОТЫҚТЫРҒЫШ МИКРООРГАНИЗМДЕР КОНСОРЦИУМДАРЫНЫҢ МҰНАЙДЫ ЫДЫРАТУЫНА ОРТАНЫҢ ТҰЗДЫЛЫҒЫ МЕН pH ӘСЕРІ

Түйін

Термотолерантты мұнайототықтырғыш микроорганизмдердің үш консорциумының мұнайды ыдыратуына ортаның тұздылығы мен pH-ның әсері зерттелді. Зерттелетін консорциумдар ортадағы жоғары NaCl мөлшеріне төзімділігі және жоғары мұнайототықтырғыш белсенділік танытқаны анықталды. Сонымен 14 тәуліктік өсіру кезінде ортада 2% NaCl бар мұнайды пайдаға асыру дәрежесі 50,7-66,8%, 5% - 65,5-72,8%, 10% - 69,0-73,5% құрады.

Зерттелетін консорциумдардың жоғары ыдырату қабілеті ортаның әртүрлі pH мәндерінде көрінеді. Олар сілтілі ортада ең жоғары белсенділікті көрсетті (pH 8 және 9), бұл мәндерде мұнайдың ыдырау дәрежесі 80% -дан астам болды. Қышқыл ортада (pH 5 және 6) 57,1-67,6% және 51,2-56,9% мұнай пайдаланылды, pH 7 кезінде - 58,7-62,9% болды.

Кілтті сөздер: мұнаймен ластану, мұнайототықтырғыш микроорганизмдер, консорциум, биоремедиация, тұздылық, ортаның pH.

IRSTI: 34.27.39

E.R. FAIZULINA^{1*}, L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOVA¹,
G.B. BAIMAKHANOVA¹, S.A. AITKELDIYEVA¹, I.E. SMIRNOVA¹,
Z. ALEXIEVA²

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

*e-mail: elmira_f@mail.ru

INFLUENCE OF SALINITY AND pH OF THE MEDIUM ON OIL DEGRADATION BY CONSORTIA OF THERMOTOLERANT OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.10

Abstract

The influence of salinity and pH of the medium on oil degradation by three consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms was studied. It was found that the studied consortia are resistant to high NaCl content in the medium and have high oil-oxidizing activity. So for 14 days of cultivation, the degree of utilization of oil with 2% NaCl in the medium was 50.7-66.8%, with 5% - 65.5-72.8%, with 10% - 69.0-73.5%.

The high destructive ability of the studied consortia at different pH values of the medium is shown. They demonstrated the greatest activity in an alkaline environment (pH 8 and 9), the degree of oil destruction at these values was over 80%. In an acidic environment (pH 5 and 6), 57.1-67.6% and 51.2-56.9% of oil were utilized, at pH 7 - 58.7-62.9%.

Keywords: oil pollution, oil-oxidizing microorganisms, consortium, bioremediation, salinity, medium pH.

The growth and development of industry has now led to intense environmental pollution with toxic substances. Among such pollutants one of the first places belongs to oil and oil products. At all stages, from exploration and production of oil to the use of petroleum products, to some extent, products are released into the environment, which leads to a deterioration in the environmental situation and a negative impact on human health [1, 2].

When oil and oil products enter the soil, they have a depressing effect on vegetation and suppress soil microflora. As a result, soil fertility is reduced, making them unsuitable for agricultural use. At the same time, the natural restoration of oil-contaminated soils can take decades [3]. When using only mechanical, physical and chemical methods of remediation, the necessary level of environmental purification is not provided. Such methods can lead to secondary pollution and disruption of natural landscapes [4, 5].

The growing need for remediation of contaminated sites has led to the development of technologies that focus on biological detoxification and destruction of organic pollutants. Biological treatment is an alternative method of removing pollutants, since it does not have a harmful effect on the environment [6]. Bioremediation is one of these technologies. When using it, various pollutants are removed or neutralized [7]. The bioremediation method is based on the use of active microbial strains that exhibit the ability to degrade oil hydrocarbons. Hydrocarbon-oxidizing microorganisms, due to their multifunctionality, enzymatic activity and high reproduction rate, are able to use oil hydrocarbons as the only source of carbon and bring the process of organic matter transformation to complete mineralization. The end products of this biotransformation are carbon dioxide, water and other environmentally neutral compounds. That is why the bioremediation of soils contaminated with oil and oil products by active strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms is proposed as the most promising method for combating this pollution [8, 9].

About 60% of the world's oil reserves are located in the territories of countries with a hot climate, where the specific nature, in particular, temperature conditions, forces a more careful approach to the choice of the method of remediation of contaminated lands [10, 11]. Temperature is one of the key factors affecting the physical properties and chemical composition of petroleum hydrocarbons, and, consequently, their biodegradation. Depending on it, bacterial activity and, accordingly, the rate of oil biodegradation may undergo seasonal changes [12, 13]. Salinity and pH of the environment also influence microbiological processes. Qin et al. suggested that salinity has a great influence on the processes of bioremediation and biodegradation, and also affects the growth and diversity of microbes [14]. Salinity has a negative effect on the activity of a number of key enzymes that become more complex in the process of hydrocarbon degradation [15]. Soil acidity also plays an important role: under natural conditions, microorganisms-bi destructors are usually active in a narrow pH range (neutral or close to neutral values) [16].

Soil pollution with oil and oil products is an urgent problem for Kazakhstan. It is known that in the oil-producing regions of Kazakhstan the climate is sharply continental, characterized by sharp seasonal and daily temperature fluctuations. One of the main problems of remediation of territories in hot climates is the fact that high temperatures reduce the viscosity of oil and, thus, accelerate its diffusion into the soil. At the same time, elevated average daily temperatures cause rapid evaporation of water from the soil, which leads to its salinization [17].

In Western Kazakhstan, in the oil fields, there are pockets of petrochemical pollution, salinization by waste formation waters, characterized by high mineralization of waters with a predominance of sodium chloride in the salt complex [18]. In addition, crude oil spills cause alkalization of varying degrees of soil solution, which is dependent on oil concentration [19].

The aim of the research was to study the ability of consortia of oil-oxidizing microorganisms to oxidize oil hydrocarbons at various concentrations of NaCl and pH of the medium.

Materials and methods of research

The objects of research were selected active consortia of oil-oxidizing bacteria, consisting of strains:

9 - *Rhodococcus fascians* K3, *Dietzia* sp. 84U, *Pusillimonas* sp. 1/8an;

18 – *Dietzia* sp. 34, *Dietzia* sp. 84U, *Pusillimonas* sp. 1/8an;

19 - *Dietzia* sp. 34, *Dietzia* sp. 84U, *Rhodococcus* sp. 1D/1.

Nutrient media. Modified VD mineral medium of the following composition, g/l: NH_4NO_3 - 1.0, K_2HPO_4 - 1.0, KH_2PO_4 - 1.0, MgSO_4 - 0.2, $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.02, FeCl_3 - traces, NaCl - 10.0, pH=7.0-7.2.

Oil. Crude oil from the Dossor field, Atyrau region.

The study of the destructive ability of selected consortia at different salinity values of the nutrient medium was carried out in Erlenmeyer flasks with VD mineral medium, to which 2, 5, and 10% NaCl was added. Oil was added at the rate of 2% by volume. The flasks were incubated in a thermostatically controlled shaker at 30°C for 14 days. The quantitative consumption of oil was determined by the gravimetric method.

The destructive ability of the selected consortia at different pH values (5-9) was studied in a liquid VD mineral medium. pH 5 and 6 were adjusted by acidifying the medium with sulfuric acid; pH 8 and 9 were adjusted by alkalization with 10% NaOH solution. Oil was added at the rate of 2% by volume. The flasks were incubated in a thermostatically controlled shaker at 30°C for 14 days. The quantitative consumption of oil was determined by the gravimetric method.

All experiments were performed in triplicate.

Statistical processing of the research results was carried out according to the generally accepted criteria of variance-statistical analysis with the calculation of mean values (M), arithmetic mean error (m) using the Microsoft Excel, 2010 software package. The statistical significance of differences in mean values was assessed according to the standard method [20]. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Research results and discussion

It is known that the soil in the oil fields of Kazakhstan is saline to varying degrees, with chloride salinity predominating. In this regard, the destructive ability of the selected consortia at different values of the salinity of the medium (2%, 5%, 10%) was studied.

The results of the study showed that the selected consortia withstood NaCl concentrations up to 10% (Table 1). At 2% NaCl, consortium 19 showed the highest oil-oxidizing activity, the degree of oil destruction during its cultivation was 66.8%. The lowest activity under these conditions was in consortium 9, which utilized 50.7% of the oil.

At 5% NaCl content in the medium, consortia 18 and 19 degraded oil at approximately the same level. After 14 days of cultivation, its content decreased by 71.2% and 72.8%, respectively. Consortium 9 was also less active, the degree of oil destruction under its influence was 65.5%.

At 10% NaCl content in the medium, the highest oil-oxidizing activity was observed in consortium 9, which utilized 73.5% of the oil. Consortium 19 was less active.

Table 1 - Destruction of oil of the Dossor oilfield by active consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms at different concentrations of NaCl in the medium

Consortium	Degree of oil destruction, %		
	2% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
9 (<i>Rhodococcus fascians</i> K3, <i>Dietzia</i> sp. 84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8aH)	50,7	65,5	73,5
18 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Pusillimonas</i> sp. 1/8aH)	64,3	71,2	71,9
19 (<i>Dietzia</i> sp.34, <i>Dietzia</i> sp.84Y, <i>Rhodococcus</i> sp. 1Д/1)	66,8	72,8	69,0
control	20,6	21,0	19,1

A number of studies have shown that the presence of NaCl in the environment weakened the degradation of oil and oil products, presumably due to its inhibitory effect on bacterial growth. An increase in salt concentration also reduced the rate of biodegradation [15, 21]. In our studies, it was found that the destructive ability of the studied consortia, on the contrary, increased with an increase in the concentration of NaCl in the medium. Thus, the lowest degree of oil destruction was noted at 2% salt content. Consortium 9 utilized the maximum amount of oil at 10% NaCl. The degree of oil destruction under the influence of consortium 18 at 5% and 10% salt content differed slightly - 71.2 and 71.9%, respectively. Consortium 19 showed a slight decrease in activity - from 72.8% to 69.0%. A higher rate of oil biodegradation by consortia at an increased concentration of NaCl may be due to the fact that the microorganisms that make up their composition are adapted to these conditions, since were isolated from oil-contaminated soils of the Atyrau region, characterized by a high level of salinity.

The pH of the environment is also one of the factors affecting the bioremediation of oil-contaminated ecosystems. The acidity of the environment affects such processes as transport through the cell membrane and the balance of catalytic reactions, as well as the activity of enzymes. The pH level can vary greatly and must be taken into account when improving biological treatment methods [6]. In this regard, the oil-oxidizing activity of selected consortia was studied during growth in a liquid mineral medium with oil at different acidity values (table 2).

Table 2 - Destruction of oil at the Dossor oilfield by active consortia of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms at different pH values of the medium

Consortium	Degree of oil destruction, %				
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
9	63,2	51,2	58,7	84,5	87,9
18	67,6	53,4	60,3	92,4	81,3
19	57,1	56,9	62,9	94,4	82,3
control	15,7	16,3	15,9	16,2	16,3

From the data in Table 2, it can be seen that all consortia showed the least activity at pH 6, and the highest at pH 8 and 9.

In an acidic environment (pH 5), oil was best degraded by consortium 18. At pH 6, 7, and 8, consortium 19 was the most effective, and at pH 9, consortium 9.

Consortium 19 at pH 5 and 6 utilized oil at the same level - 57.1% and 56.9%, respectively. With an increase in pH values, the destructive activity also increased, reaching a maximum at pH 8 (94.4%). At pH 9, the degree of oil degradation by this consortium decreased, but remained at a high level - over 80%.

Consortia 9 and 18 showed the least activity in a slightly acidic and neutral medium; at pH 5, it was somewhat higher. Consortium 18 utilized the largest amount of oil at pH 8 - 92.4%, and at pH 9 - 11% less. The degree of oil degradation under the influence of consortium 9, on the contrary, increased with an increase in pH from 8 to 9.

Conclusion

Thus, the studied consortia showed resistance to high salt content and high oil-oxidizing activity. With a NaCl content of 2% in the nutrient medium, the degree of oil utilization for 14 days of cultivation was 50.7-66.8%, at 5% - 65.5-72.8%, at 10% - 69.0-73.5%. The natural loss of oil amounted to 19.1-21.0%.

The ability of selected active consortia to biodegrade oil at different pH values was shown. The consortia showed the highest activity in an alkaline environment (pH 8 and 9), the degree of oil destruction at these values was 84.5-94.4% and 81.3-87.9%, respectively. In an acidic environment (pH 5 and 6), 57.1-67.6% and 51.2-56.9% of oil were utilized, at pH 7 - 58.7-62.9%. At the same time, the natural loss of oil amounted to 19.0-21.3%.

Funding

The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant AP09260140).

References:

- 1 Karlapudi A. P., Venkateswarulu T.C., Tammineedi J., Kanumuri L. Bharath K. R., Dirisala V. R., Kodali V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 2018, 4(3), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- 2 Khanpour-Alikelayeh E., Partovinia A., Talebi A., Kermanian H. Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111103>
- 3 Karaseva E.V. Bioremediaciya chernozemnoj pochvy, zagryaznennoj neft'yu. *Biotekhnologiya*, 2009, 2, 122-129.
- 4 Kirij O.A., Kolesnikov S.I., Zinchuk A.N. Primenenie bakterial'nogo preparata «Destroj» dlya likvidacii zagryaznenij nefteproduktami presnyh vodoemov. *Politematicheskij setevoy elektronnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU)*, 2012, 9(83). - URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/09/pdf/46.pdf>
- 5 Kolesnikov S.I., Gajvoronskij V.G., Rotina E.N., ZHarkova M.G., Denisova T.V., Kazeev K.SH. Rezul'taty eksperimental'nogo izucheniya zagryazneniya buryh pochv mazutom. *Geoekologiya*, 2011, 2, 183-187.
- 6 Adnan B. Al-Hawash, Maytham A. Dragh, Shue Li, Ahmad Alhujaily Hayder A. Abbood, Xiaoyu Zhang Fuying M. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2018, 44 (2), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- 7 Anastasios I. Zouboulis, Panagiotis A. Moussas, Savvina G. Psaltou Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation. *Encyclopedia of Environmental Health. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 2018, 1037-1044. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00035-0>
- 8 Kurakov A.V., Il'inskij V.V., Kotelevcev S.V., Sadchikov A.P. Bioindikaciya i reabilitaciya ekosistem pri neft'nyh zagryazneniyah. M.: Grafikon, 2006, 336 s.

- 9 Sunita J. Varjani Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 2017, 223, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- 10 Piyadasa H.T.N.I. Marine environment protection from offshore oil and gas: activities in Sri Lanka. World Maritime University Dissertations, 2014, 185 p. https://commons.wmu.se/all_dissertations/485/
- 11 Veerasingam S., Vethamony P., Mani Murali R., Babu, M.T. Sources, Vertical Fluxes and Accumulation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments from the Mandovi Estuary, West Coast of India. *Int. J. Environ. Res.*, 2015, 9(1), 179-186. <https://doi.org/10.22059/IJER.2015.887>
- 12 Boqun Liu, Meiting Ju, Jinpeng Liu, Wentao Wu, Xiaojing Li Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 106(1–2), 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.053>
- 13 Myat Thwe Myint Aung, Qintong Li, Seiya Takahashi, and Motoo Utsumi Effect of Temperature on Hydrocarbon Bioremediation in Simulated Petroleum-Polluted Seawater Collected from Tokyo Bay. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2018, 54(3), 95-104. <https://doi.org/10.2521/jswtb.54.9>
- 14 Qin X., Tang J., Li D., Zhang Q. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2012, 55(3), 210-217. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03280.x>
- 15 Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani N. R. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *J. Adv. Res.*, 2017, 8(6), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.06.008>
- 16 Dyomin A.V., Kostin M.V., Sadchikov A.V. Primenenie produkta biogazovoj ustanovki kak neftedestruktora pri bioremediacii neftezagryaznennyh zemel'. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2014, 4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14002>
- 17 Delegan YA.A., Vetrova A.A., Chernyavskaya M. I., Titok M.A., Filonov A. E. Termotolerantnye aktinomicety kak agenty remediatsii neftezagryaznennyh gruntov i vod v usloviyah zharkogo aridnogo klimata. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta Estestvennye nauki*, 2015, 4, 248–258.
- 18 Tomina T.K. Zasolennost' pochv territorii neftyanyh mestorozhdenij Karaarna i Vostochnaya Kokarna. *Pochvovedenie i agrohimiya*, 2015, 3, 117-130.
- 19 Kenzhegaliev A., Kulbatyrov D.K., Bazarbekova M.M., Zhuniskankyzy K. Issledovaniya i razrabotka rekomendatsii po vosstanovleniyu degradirovannoj pochvy neftedobyvayushchih mestorozhdenii. *Atyrau*, 2021, 250 s.
- 20 Glanc S. Mediko-biologicheskaya statistika / per. s angl. M.: Praktika, 1998, 459 s.
- 21 Dariush Minai-Tehrani, Ali Herfatmanesh, Forood Azari-Dehkordi, Saiid Minooi Effect of Salinity on Biodegradation of Aliphatic Fractions of Crude Oil in Soil // *Pakistan Journal of Biological Sciences* – 2006. – Vol. 9. – P. 1531-1535. URL: <https://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2006/1531-1535.pdf>

MPNТИ: 34.27.19:62.09.39: 65.09.39

Г.К. АБИТАЕВА^{1*}, З.С. САРМУРЗИНА¹, Г.Н. БИСЕНОВА¹,
Б.К. МУСАБАЕВА¹, Т.Ч. ТУЛТАБАЕВА²

¹Республиканская коллекция микроорганизмов, Астана, Казахстан

²Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Астана, Казахстан

*e-mail: gulyaim_as@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ПРОБИОТИКОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НАПИТКОВ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11

Аннотация

Объекты исследования – молочнокислые бактерии (МКБ), выделенные из биологических образцов, и коллекционные штаммы МКБ.

Цель – характеристика штаммов пробиотиков для разработки напитков профилактического назначения.

В процессе работы проведен скрининг пробиотически активных штаммов МКБ, в результате которого отобрано 17 наиболее активных культур, среди которых 13 коллекционных штаммов из Биобанка промышленных микроорганизмов Республиканской коллекции микроорганизмов и 4 лабораторных изолята. Изучен пробиотический потенциал бактерий: продукция молочной кислоты, антагонизм к условно-патогенным микроорганизмам, адгезивные свойства, устойчивость к неблагоприятным условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Идентификация с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper позволила отнести изоляты к следующим видам: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

В результате проведенных исследований созданы консорциумы стартерных культур из штаммов *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus plantarum* 1A, *Lactobacillus plantarum* 17 A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 и отобран оптимальный вариант, соответствующий основным технологическим характеристикам с учетом биосовместимости штаммов для включения в состав разрабатываемого напитка профилактического назначения.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, штамм, пробиотик, антагонизм, адгезия.

На сегодняшний день одним из основных направлений в области здорового питания является создание инновационных технологий приготовления продуктов (напитков) профилактического значения, обогащенных минеральными веществами и витаминами, пробиотиками и пребиотиками [1]. Они различаются разнообразным составом, однако ассортимент основан на целенаправленном использовании молока и сырья немолочного происхождения, придающего новым продуктам белковую, липидную, углеводную, витаминную или минеральную направленность [2]. Рынок молочной продукции расширяется появлением новых функциональных продуктов таких как, биомолоко, биокефир, биойогурты, которые представляют собой продукты ферментации молока молочнокислыми бактериями. Пробиотические бактерии, которые обычно используют в ферментированных напитках, это - *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Bifidobacterium* sp. [3]. При разработке комбинированных молочных продуктов уделяется внимание регулированию аминокислотного, жирнокислотного, минерального и витаминного состава, а также приданию продуктам лечебно-профилактических свойств за счет включения в их состав биологически активных веществ и пищевых добавок натурального происхождения.

Анализ научной литературы, патентов по данной научной проблеме свидетельствует о том, что разработка различных рецептур и технологий приготовления лечебно-профилактических продуктов (напитков) с использованием пробиотиков, является

актуальным направлением, которые на рынке приобретают все большую популярность среди потребителей, являясь источником многих необходимых для человека веществ [4-7].

К пробиотическим производственным штаммам предъявляется ряд требований, среди которых: наличие антагонистических свойств по отношению к клиническим и тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, устойчивость к действию секретов желудочно-кишечного тракта и др. С этой целью актуализируется задача по характеристике штаммов пробиотиков для включения в состав напитков профилактического назначения.

Материалы и методы

Выделение чистой культуры

В целях изолирования молочнокислых бактерий из различных традиционных продуктов домашнего приготовления (казы, сметана, иримшик, масло, айран, кумыс, балык) был использован метод, описанный в работе E. Nagyzbekkyzy [8]. Для культивирования МКБ использовали специализированные среды MRS фирмы HiMedia с инкубацией при 37 °C в течение двух суток в микроаэрофильных условиях в термостате (redLINE RI-53, Германия).

Идентификацию изолятов проводили с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper. Образцы для MALDI-TOF MS готовили следующим образом: проводили прямой перенос свежей единичной колонии на полированную стальную мишень MSP 96 (Bruker Daltonik), подсушивали. Покрывали 1 мл насыщенного раствора α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix solution в 50% ацетонитриле-2.5% трифторуксусной кислоты (Bruker Daltonik) и высушивали при комнатной температуре [9].

Исследование антагонистической активности методом диффузии в агар.

Готовили суспензию клеток суточных культур МКБ в количестве 1мл/1мл (по стандарту бактериальной мутности) и наносили на поверхность питательной среды в чашки Петри (можно вносить в расплавленную и остуженную среду 0,1 мл суспензии МКБ, перемешивать и разливать в чашки Петри). Далее вырезали лунки с верхом диаметром 10 мм и заполняли их культурами тест-штаммов (0,1 мл). Через сутки измеряли диаметр зоны подавления роста бактерий [10].

Исследование кислотообразующей активности по методу Тернера [11].

Кислотообразующую активность молочнокислых бактерий и консорциумов определяли методом Тернера, перед посевом обязательно проводили определение кислотности молока.

Исследование адгезии к эритроцитам.

Адгезивность штаммов изучали в системе *in vitro* на формализированных эритроцитах человека 0 (1) (Rh+) по методике В. Брилиса. Производили подсчет не менее 100 эритроцитов в не менее чем в 5 полях зрения. Определяли средний показатель адгезии (СПА), коэффициент адгезии. СПА определяли по среднему числу микробов, прикрепившихся к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов. Адгезивность считают нулевой при СПА от 0 до 1,0, низкой – 1,01-2,0, средней – 2,01-4,01, высокой – свыше 4,0. Из общего числа учитываемых эритроцитов вычисляли процент эритроцитов [12].

Определение устойчивости к действию желчи.

Устойчивость изучаемых штаммов к желчи определяли путем внесения суточной культуры в бульонную среду МРС, содержащей 0,3% и 0,5% бычьей желчи. Бактериальный рост анализировали путем подсчета жизнеспособных колоний после 0, 2 и 4 часов культивирования в агаризованной среде при 37 °C в течение 48 часов. Значения pH были приведены до 8,0 в соответствии с экспериментальными протоколами, разработанными для лактобацилл. Фактически pH желчи и поджелудочного сока, выделяемого в кишечник, составляет примерно 8,0 [13].

Определение устойчивости к последовательному действию кислоты и желчи.

Имитацию транзита по ЖКТ проводили по методике Haller [14]. Культуры вначале инкубировали при pH 2,0-3,0 в физиологическом растворе в течение 1-2 ч, затем помещали в 1 % желчный бульон. Начальная концентрация культуры микроорганизма должна составлять 10^7 КОЕ/мл

Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием среднего показателя, квадратичного отклонения средней, ошибки средней, коэффициента Стьюдента, уровень доверительного интервала p . Использовалась программа «Statis». Результаты считались достоверными, если вероятность ноль-гипотезы не превышала 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Из биологических образцов выделено 10 изолятов, имеющих морфологически характерные для молочнокислых бактерий признаки, а именно однородные колонии белого или беловато-молочного цвета с ровными краями и выпуклой поверхностью, с кисломолочным запахом. После оценки титра жизнеспособности (не менее 10^7 - 10^9) КОЕ/мл для дальнейшей работы взято 4 отобранных изолята и 13 коллекционных штаммов МКБ рода *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Pediococcus* (таблица 1). Идентификация с использованием системы Bruker MALDI-TOF Biotyper позволила отнести 4 отобранных изолята к следующим видам: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

Таким образом, количество исследуемых нами объектов составляет 17 МКБ, как выделенных, так и коллекционных штаммов.

Таблица 1 – Коллекционные штаммы МКБ из РКМ и выделенные из биологических образцов

Наименование штамма	Источник
<i>Lactobacillus sakei</i> 24 A B-RKM 0559	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0357	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0670	B-RKM
<i>Lactobacillus casei</i> 15 LB B-RKM 0549	B-RKM
<i>Lactobacillus fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	B-RKM
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	B-RKM
<i>Lactobacillus brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0024	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0019	B-RKM
<i>L. plantarum</i> 17A	лабораторный изолят
<i>L. plantarum</i> 4 A	лабораторный изолят
<i>L. casei</i> Y1	лабораторный изолят
<i>L. paracasei</i> 2A	лабораторный изолят

Примечание: B-RKM - Биобанк промышленных микроорганизмов Республиканской коллекции микроорганизмов

Изучение антимикробной активности.

Одним из важных факторов при скрининге на пробиотических препаратов является антагонизм к различным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

В наших исследованиях антагонистическая активность изучалась к таким тест-штаммам, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* из Биобанка промышленных микроорганизмов РКМ.

Результаты антагонистической активности исследуемых объектов представлены в таблице 2, низкая активность – 1,0-4,9 мм, средняя – 5,0-8,9, высокая - более 9 мм. В группу неактивных вошли культуры, не подавляющие тест-штаммы.

Большинство отобранных культур показало среднее значение антагонистической активности к патогенам *Streptococcus pyogenes* и *Klebsiella pneumoniae*: диаметр зон подавления роста не превышала 9 мм. Высокую степень антагонизма проявили лишь культуры В-РКМ 0149 (11,33±0,18 мм) – к *Streptococcus pyogenes* и (11,2±0,3мм) – к *Klebsiella pneumoniae*. Штамм 2 А (12,33±0,58 мм и 11,33±0,4 мм, соответственно).

Таблица 2 – Диаметр зоны ингибирования (мм), обусловленной антимикробной активностью штаммов МКБ в отношении тест-штаммов

Штамм МКБ	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Kl. pneumoniae</i>	<i>Str. pyogenes</i>
<i>L. sakei</i> 24 А В-РКМ 0559	6,0±1*	7,7±0,57	2,4±0,3	7,8±0,3	6,8±0,5
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0149	10,1±0,53	10,0±1*	10,4±0,2	11,2±0,3	11,33±0,18
<i>L. pentosus</i> 14 LB В-РКМ 0604	6,4±0,3	6,8±0,4	3,2±0,7	5,4±0,6	5,6±0,2
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0357	7,1±0,4	5,4±0,6	0	7,3±0,4	7,8±0,6
<i>L. plantarum</i> В-РКМ 0670	8,1±0,3	6,5±0,2	2,0±0,3	6,0±0,2	6,8±0,6
<i>L. casei</i> 15 LB В-РКМ 0549	9,1±1,0*	6,4±0,3	3,3±1*	7,7±0,9	8,8±0,2
<i>L. fermentum</i> 9 LB В-РКМ 0607	6,1±0,2	7,1±0,2	0	6,8±0,5	7,1±0,8
<i>P.pentosaceus</i> 22 LB В-РКМ 0598	3,0±0	6,0±1*	3,3±0,6	5,4±0,7	6,9±0,5
<i>L.brevis</i> 4 LB В-РКМ 0610	3,8±0,4	6,6±0,6	0	6,4±0,3	7,8±0,7
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0024	8,1±0,2	5,8±1*	2,9±0,4	8,8±0,6	8,5±0,3
<i>Lc.lactis</i> В-РКМ 0149	7,4±0,6	6,9±0,4	2,4±0,7	7,9±0,2	8,7±0,5
<i>L.plantarum</i> 5LB В-РКМ 0547	4,6±0,7	7,4±0,2	0	6,2±0,4	6,7±0,1
<i>L.plantarum</i> В-РКМ 0019	6,7±0,2	5,9±0,6	0	8,4±0,6	8,1±0,4
<i>L.plantarum</i> 17А	8,1±0,9	9,9±0,57	11,1±0,4	9,4±0,2	8,5±0,5
<i>L.plantarum</i> 4 А	12±1,0*	14,5±0,2	7,3±0,3	8,4±0,2	7,9±0,7
<i>L. casei</i> Y1	14,6±0,4	11,5±0,3	9,8±0,6	7,4±0,2	8,4±0,5
<i>L. paracasei</i> 2А	11±0,3	15,5±0,5	12,0±1	11,33±0,4	12,33±0,58

Примечание: * p<0,001; ** p<0,01; *** p<0,02; **** p<0,05

Зоны ингибирования: 0 мм - нулевая активность; 1,0-4,9 мм - низкая активность; 5,0-8,9 мм - средняя; ≥ 9 мм - высокая

По отношению к *Staphylococcus aureus* показатели антагонизма были выше среднего у четырех культур *Lc.lactis* В-РКМ 0149 (10,0±1 мм), штамм 17А (14,5±0,2 мм), штамм Y1 (11,5±0,3мм) и штамм 2 А (15,5±0,5мм).

Наименьшие показатели антагонистической активности у всех культур были отмечены к тест-штамму *C. albicans*, а у *Lc.lactis* В-РКМ 0357, *L. fermentum* 9 LB В-РКМ 060, *L.brevis* 4 LB В-РКМ 0610, *L. plantarum* 5LB В-РКМ 0547 и *L. plantarum* В-РКМ 0019 она полностью отсутствовала (=0). Лишь четыре культуры: изолят 2 А, изолят Y1, *Lc. lactis* В-РКМ 0149 и штамм 17А подавляли рост данного тест-штамма с активностью выше средней.

К *Escherichia coli* высокие показатели антагонистической активности показали *Lc. lactis* В-РКМ 0149 (10,1±0,53 мм), *L. casei* 15 LB В-РКМ 0549 (9,1±1,0 мм), штамм 4 А (12±1,0 мм), штамм Y1 (14,6±0,4 мм) и штамм 2 А (11±0,3 мм). Низкая активность зарегистрирована у *P. pentosaceus* 22 LB В-РКМ 0598, *L.brevis* 4 LB В-РКМ 0610, *L. plantarum* 5LB В-РКМ 0547 (3,0±0 мм, 3,8±0,4мм и 4,6±0,7 мм, соответственно).

Таким образом, высокой антагонистической активностью в отношении всех испытанных тест-культур обладают культуры: *Lc.lactis* В-РКМ 0149, штамм 17А, штамм 4 А, штамм Y1 и штамм 2 А. Слабыми антагонистами являются *P. pentosaceus* 22 LB В-РКМ

0598, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610. К тест-штамму *Candida albicans* у ряда культур антагонистическая активность не была выявлена.

Исследование кислотообразующей активности.

Одним из наиболее известных биологических свойств молочнокислых бактерий является способность продуцировать молочную кислоту.

Неактивными считаются штаммы, титруемая кислотность которых колеблется в пределах 20-80° Т, а те штаммы, у которых этот показатель выше 120°Т, считаются высокоактивными. В приведенной ниже таблице 3 отображены показатели кислотообразующей активности исследуемых штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о хорошей кислотообразующей способности большинства штаммов. Этот параметр отмечен у штаммов *Lactococcus lactis* B-RKM 0357, *Lactobacillus plantarum* B-RKM 0019, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus plantarum* 17A, *Lactobacillus plantarum* 4 A.

Таблица 3 – Воздействие бычьей желчи на рост МКБ

Наименование штамма	Кислотообразование в молоке, °Т	Концентрация бычьей желчи (%)		Средний показатель адгезии (СПА)
		0,3	0,5	
<i>L. sakei</i> 24 A B-RKM 0559	73	++	++	3,8 ± 1,7**
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	119	+	+	3,5 ± 1,6
<i>L. pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	71	-	-	2,7 ± 1,08
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0357	125	++	+	3,5 ± 1,6
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0670	123	-	-	2,1 ± 1,08
<i>L. casei</i> 15 LB B-RKM 0549	58	-	-	2,2 ± 1,0
<i>L. fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	40	-	-	2,4 ± 1,0
<i>P.pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	55	-	-	0,4 ± 0,23
<i>L.brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	115	+	+	1,9 ± 0,9
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0024	33	++	+	3,2 ± 1,4
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	127	+	+	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	51	-	-	3,0 ± 1,1
<i>L.plantarum</i> B-RKM 0019	120	-	-	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 17A	126	++	++	4,0 ± 1,98**
<i>L.plantarum</i> 4 A	128	+	-	5,8 ± 2,21***
<i>L. casei</i> Y1	145	++	++	6,6 ± 2,38***
<i>L. paracasei</i> 2A	130	++	++	4,8 ± 1,0

Примечание: ++ рост хороший; + видимый рост; - отсутствие роста

* p<0,001; ** p<0,01; *** p<0,02; **** p<0,05

СПА: 0-1,0 - нет активности; 1,0-2,0 - Слабый; 2,01-4,01 - Умеренный; ≥ 4,0 -высокий.

Изучение адгезивной активности.

В связи с тем, что защитные функции лактобацилл реализуются благодаря адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника, конкуренции за рецепторы связывания, блокады адгезии и колонизации слизистых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, была исследована адгезивная способность лактобактерий.

Исследование адгезивности штаммов проводилось *in vitro* на формализированных эритроцитах человека 0 (1) (Rh+) по методике В. Брилиса. Показано, что все коллекционные штаммы проявляют адгезивную активность, 11 штаммов обладают средней степенью адгезии, 1 штамм проявил слабую степень СПА, 1 штамм не обладает данным свойством. Выявлено, что культуры МКБ, выделенные из биологических образцов, обладают способностью к адгезии в высокой степени. Значения показателей адгезии представлены в таблице 3.

Устойчивость культур к пробам, имитирующим транзит по желудочно-кишечному тракту.

Коллекционные культуры в количестве 13 штаммов были исследованы на устойчивость к воздействию бычьей желчи концентрациях 0,3% и 0,5%, 6 из которых были способны расти в присутствии желчи в исследуемых концентрациях. 4 выделенные культуры бактерий не подавляются желчью и способны расти во всех концентрациях (таблица 3). Таким образом установлено, что 10 культур МКБ проявляют активность в отношении двух концентраций желчи, что является основанием при выборе пробиотически активных культур.

Имитацию транзита по ЖКТ проводили по методике Haller и соавт. (2001). Устойчивость к действию кислоты обнаружена у 13 лактобацилл с титром жизнеспособных клеток от 10^4 до 10^8 КОЕ/мл. Основную массу составляют культуры с показателем ЖСП – 10^7 - 10^8 КОЕ/мл.

Полученные результаты устойчивости лабораторных изолятов к стресс-факторам *in vitro* указывают на способность штаммов лактобацилл к выживанию при неблагоприятных для них условиях в верхних отделах ЖКТ.

Технологическая характеристика молочнокислых штаммов.

Далее нами были получены консорциумы на основе двух и более молочнокислых бактерий. Для составления комбинаций были отобраны следующие виды лактобактерий: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 и 2 культуры *Lactobacillus plantarum* (17A, 4A).

В таблице 4 отмечены основные показатели, характеризующие изучаемые штаммы: органолептические свойства, консистенция, активность свертывания, кислотообразование.

Следуя полученным данным, в качестве стартерных культур для разработки кисломолочного продукта отобраны культуры, которые соответствуют основным параметрам. Кроме того, несмотря на слабые характеристики в процессе ферментации молока, а именно активность образования сгустка и кислотообразование, в работу был взят штамм *Lactobacillus brevis*, так как штамм имеет научно-производственный задел [8].

При составлении консорциумов отобраны штаммы, обладающие антагонистической способностью, адгезивной активностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам желудочно-кишечного тракта.

Таблица 4 - Основные показатели активности и энергии кислотообразования

Культуры	Текстуральные свойства конечного продукта	Органолептические свойства сгустков	Сквашивание (ч)	pH	Кислот. активность
<i>L. casei</i> Y1	скашивание отличное, консистенция однородная, вязкость хорошая, вкус кисломолочный	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный	3,5-4	6,4	66°
<i>L. paracasei</i> 2A	скашивание хорошее, консистенция густая, вязкость средняя, вкус кисломолочный	Цвет молочный, вкус со вкусом кефира	4-4,45	6,5	75°
<i>L. brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	Скашивание слабое, полужидкая консистенция	Цвет белый, запах молочный, вкус слегка кисловатый	14	5,0	102°
<i>L. plantarum</i> 4A	Скашивание хорошее, слабая вязкость, густая консистенция	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный	5	6,0	68°
<i>L. plantarum</i> 17A	Скашивание хорошее, вязкость средняя, однородная сметанообразная консистенция	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный	6	6,4	66°

При создании комбинаций учитывали биосовместимость штаммов, входящих в консорциум. Оценку биосовместимости проводили путем совместного культивирования на плотной агаровой среде методом перпендикулярных штрихов. О совместимости штаммов судили по равномерному росту и отсутствию зон задержки роста.

При первичном отборе составлены следующие комбинации биосовместимых штаммов молочнокислых бактерий: Вариант 1: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; Вариант 2: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; *Lactobacillus paracasei* Y2; Вариант 3: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2 A; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 4A; Вариант 4: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* A2; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 17A.

Для устойчивого состояния штаммов применяли метод непрерывного культивирования. С этой целью в стерильные пробирки с обезжиренным молоком вносили по 100 мкл каждой культуры в ассоциациях. Затем пробирки помещали в термостат при температуре 37° и через каждые 12 часов культуры пересеивали в свежее молоко. После каждого отрезка культивирования снимали такие параметры как кислотообразование и органолептика. Путем микроскопирования проводили микробиологический контроль и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. Непрерывное культивирование продолжали до получения постоянного соотношения микроорганизмов, входящих в состав консорциумов.

Таким образом, на основе визуальной оценки биосовместимости и экспериментальном подборе соотношения культур, были составлены несколько вариантов (таблица 5).

Таблица 5 – Характеристики полученных продуктов, полученные в процессе ферментации молока предложенными вариантами консорциумов

Варианты комбинаций	Текстуральные свойства конечного продукта	Органолептические свойства сгустков	Активность сквашивания (ч)	pH	Кислотообразование по Тернору°	КОЕ/мл
Вариант 1	Сквашивание хорошее, консистенция однородная, вязкость хорошая	Цвет молочный, вкус чистый кисломолочный с приятным привкусом	4,5	3,6	70	$2,8 \times 10^8$
Вариант 2	Сквашивание хорошее, вязкость хорошая, плотная консистенция однородная	Цвет молочный, вкус приятный кисломолочный	3,5	4,0	76	4×10^9
Вариант 3	Сквашивание хорошее, консистенция однородная, вязкость удовлетворительная	Цвет молочный белый, вкус кислый	5,0	4,0	81	2×10^8
Вариант 4	Сквашивание хорошее, вязкость средняя, консистенция густая	Цвет молочный, вкус кислый	5,0	4,0	107	6×10^8

В результате исследований отобран вариант 2, в состав которого входят *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A. Данный консорциум соответствует требуемым параметрам технологических характеристик, а именно: имеет текстуральные свойства конечного продукта в виде хорошего сквашивания

и вязкости, плотной и однородной консистенции, проявляет соответствующие органолептические свойства: молочный цвет, чистый кисломолочный вкус с приятным привкусом, активность сквашивания -3,5 часов, кислотообразование по Тернеру- 90 °Т, титр пробиотических клеток - 4×10^9 КОЕ/мл.

Заключение

Штаммы молочнокислых бактерий изучены на наличие пробиотических свойств и соответствие основным технологическим характеристикам (органолептические свойства, консистенция, активность свертывания, кислотообразование) в качестве стартерных культур консорциума для разработки кисломолочного продукта. На их основе созданы 4 комбинации консорциумов стартерных культур с учетом биосовместимости штаммов. Отобран оптимальный вариант, консорциум *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A, соответствующий основным технологическим характеристикам с учетом биосовместимости штаммов для включения в состав разрабатываемого напитка профилактического назначения.

Финансирование

Настоящее исследование финансируется Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (грант № BR10764998).

Литература:

- 1 Kumar D., Lal M. K. Dutt S., Raigond P., Sudhakar S. et al. Functional Fermented Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics from Non-Dairy Products: A Perspective from Nutraceutical / Mol. Nutr. Food Res. 2022, 66: 2101059 (doi.org/10.1002/mnfr.202101059)
- 2 Guimarães J.T., Silva E.K., Ranadheera C.S. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage / Ultrason Sonochem. – 2019, 55:157-164 (doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.02.025.)
- 3 A Yelnetty and M Tamasoleng The addition of Yam Tuber (*Dioscorea alata*) flour as a source of prebiotic on biomilk synbiotic characteristics / IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2019, 247:1-6. (doi.org/10.1088/1755-1315/247/1/012052)
- 4 Balthazar C. F., Guimarães J. F. et. al The future of functional food: emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:2560–2586 (doi.org/10.1111/1541-4337.12962)
- 5 Panesar P.S., Anal A.K., Kaur R. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Opportunities, Health Benefits and Industrial Challenges / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 1-13. (doi.org/10.1002/9781119702160.ch1)
- 6 de la Rosa O., Flores-Gallegos A.C., Ascacio-Valdés J.A., Sepúlveda L., Montañez J.C., Aguilar C.N. Fructooligosaccharides as Prebiotics, their Metabolism, and Health Benefits / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 307-337 (doi.org/10.1002/9781119702160.ch13)
- 7 Grujović M. Ž., Mladenović K. G., Semedo-Lemsaddek T., Laranjo, M., Stefanović O. D., Kocić-Tanackov S. D. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:1537–1567 (doi.org/10.1111/1541-4337.12897)
- 8 Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Li K., Shaikhin S, Saduakhassova S, Kushugulova A, Marotta F. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods / Asian J. Applied Sci. – 2016, 9(143-158) (doi: 10.3923/ajaps.2016.143.158)
- 9 Schulthess B., Bloembergen G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory / Journal of clinical microbiology. 2014, 52(1089-1097)
- 10 Sarmurzina Z., Bissenova G., Zakarya K. et al. Characterization of probiotic strains of lactobacillus candidates for development of synbiotic product for kazakh population / Journal of Pure and Applied Microbiology, 2017, 11(151–161) (doi.10.22207/JPAM.11.1.20)
- 11 General pharmacopoeial article «Determination of the specific activity of probiotics: OFS. 1.7.2.0009.15». - [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIIIth ed.]. - T. II. -P. 24. (in Russ.).

12 Brilis, V.I., Brilene, T.A., Lentsner, K.P., Lentsner, A.A. Method of studying the adhesive process of microorganisms / Laboratornoe delo, 1986, 4(210–212).

13 Genci G., Trotta F., Galdini G. Ustoychivost' spor i vegetativnykh kletok *Bacillus clausii* k probam, imitiruyushchim tranzit po zheludochno-kishechnomu traktu / Zdorov'ye Ukrainy. – 2008, 19/1(57-59)

14 Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C. and Hammes, W.P. (2001) Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. Syst Appl Microbiol 24(218–226) (doi.org/10.1078/0723-2020-00023)

Г.К. АБИТАЕВА^{1*}, З.С. САРМУРЗИНА¹, Г.Н. БИСЕНОВА¹,
Б.К. МУСАБАЕВА¹, Т.Ч. ТУЛТАБАЕВА²

¹ Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы, Астана, Қазақстан

² С.Сейфуллин атындағы қазақ агротехникалық университеті, Астана, Қазақстан

*e-mail: gulyaim_as@mail.ru

ПРОФИЛАКТИКАЛЫҚ МАҚСАТТАҒЫ СУСЫНДАРДЫ ӘЗІРЛЕУГЕ АРНАЛҒАН ПРОБИОТИКАЛЫҚ ШТАММДАРДЫҢ СИПАТТАМАСЫ

Түйін

Зерттеу нысандары - биологиялық үлгілерден жаңа бөлініп алынған сүт қышқылы бактериялары (СҚБ) және коллекциялық СҚБ штамдары.

Мақсаты - профилактикалық сусындарды әзірлеу үшін пробиотикалық штаммдардың сипаттамасы

Жұмыс барысында пробиотикалық белсенді штаммдарға скрининг жүргізілді, нәтижесінде ең белсенді ретінде 17 дақыл таңдалды, олардың ішінде Республикалық микроорганизмдер коллекциясының өнеркәсіптік микроорганизмдер Биобанкінен 13 коллекциялық штамм және 4 зертханалық изолят. Пробиотикалық потенциал зерттелді, оның ішінде сүт қышқылының өндірісі, оппортунистік микроорганизмдерге антагонизм, жабысқақ қасиеттері, асқазан-ішек жолдарының қолайсыз жағдайларына төзімділігі. Bruker MALDI-TOF BIOTYPER жүйесін қолдана отырып сәйкестендіру изоляттарды келесі түрлерге жатқызуға мүмкіндік берді: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus plantarum* 1A, *Lactobacillus plantarum* 17 A, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610 штаммдарынан Стартер дақылдарының консорциумдары құрылды және штаммдардың биоүйлесімділігін ескере отырып, негізгі технологиялық сипаттамаларға сәйкес келетін оңтайлы нұсқа таңдалды. әзірленіп жатқан профилактикалық мақсаттағы сусынның құрамына енгізу.

Түйін сөздер: сүт қышқылы бактериялары, штамм, пробиотик, антагонизм, адгезия.

IRSTI: 34.27.19:62.09.39: 65.09.39

G.K. ABITAYEVA^{1*}, Z.S. SARMURZINA¹, G.N. BISSENOVA¹,
B.K. MUSSABAYEVA¹, T.Ch. TULTABAYEVA²

¹Republican collection of microorganisms, Astana, Kazakhstan

²Kazakh agro-technical university named after S.Seifullin, Astana, Kazakhstan

*e-mail: gulyaim_as@mail.ru

CHARACTERISTICS OF PROBIOTIC STRAINS FOR THE DEVELOPMENT OF PREVENTIVE DRINKS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11

Abstract

The objects of study are lactic acid bacteria (LAB) isolated from biological samples and collection strains of LAB

Purpose - characterization of probiotic strains for the development of preventive drinks

In the course of the work, screening of probiotically active strains was carried out, as a result of which 17 cultures were selected as the most active, among them 13 collection strains from the Biobank of Industrial Microorganisms of the Republican Collection of Microorganisms and 4 laboratory isolates. The probiotic potential was studied, among which, the production of lactic acid, antagonism to opportunistic microorganisms, adhesive properties, resistance to adverse conditions of the gastrointestinal tract. Identification using the Bruker MALDI-TOF Biotyper system allowed isolates to be assigned to the following species: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*.

As a result of the research, consortiums of starter cultures were created from strains of *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus plantarum* 1A, *Lactobacillus plantarum* 17 A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 and the optimal variant was selected that corresponds to the main technological characteristics, taking into account the biocompatibility of strains for inclusion in the composition of the drink for preventive purposes.

Keywords: lactic acid bacteria, strain, probiotic, antagonism, adhesion.

Today, one of the main directions in the field of healthy nutrition is the creation of innovative technologies for the preparation of products (drinks) of preventive value, enriched with minerals and vitamins, probiotics and prebiotics [1]. They differ in a variety of composition, but the range is based on the targeted use of milk and raw materials of non-dairy origin, which gives new products a protein, lipid, carbohydrate, vitamin or mineral focus [2]. The market for dairy products is expanding with the emergence of new functional products such as biomilk, biokefir, bioyogurt, which are products of milk fermentation by lactic acid bacteria. Probiotic bacteria that are commonly used in fermented drinks are *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium sp.* [3]. During development of combined dairy products, attention is paid to the regulation of amino acid, fatty acid, mineral and vitamin composition, as well as to giving the products therapeutic and prophylactic properties due to the inclusion of biologically active substances and food additives of natural origin in their composition.

An analysis of the research and patents on this scientific issue indicates that the development of various formulations and technologies for the preparation of therapeutic and prophylactic products (drinks) using probiotics is an important area that is becoming increasingly popular among consumers on the market, being a source of many necessary for human substances [4-7].

A number of requirements are imposed on probiotic production strains, among which the presence of antagonistic properties in relation to clinical and test strains of pathogenic and opportunistic microorganisms should be studied for resistance to the action of secrets of the gastrointestinal tract, etc. For this purpose, the task of characterizing probiotic strains is being updated for inclusion in preventive drinks.

Materials and methods

Isolation of culture

In order to isolate lactic acid bacteria from various traditional home-made products (kazy, homemade sour cream, irimshik, butter, ayran, koumiss, balyk) the method described in the work E. Nagyzbekkyzy was used [8]. For the cultivation of LAB, specialized MRS media (HiMedia) were used with incubation at 37°C for two days under microaerophilic conditions in a incubator (redLINE RI-53, Germany).

Isolates were identified using the Bruker MALDI-TOF Biotyper system. Samples for MALDI-TOF MS were prepared as follows: a fresh single colony was directly transferred to a polished MSP 96 steel target (Bruker Daltonik) and dried. Covered with 1 µl of a saturated solution of α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) matrix solution in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid (Bruker Daltonik) and dried at room temperature [9].

Test of Antagonistic activity of LAB

A cell suspension of daily LAB cultures is prepared in an amount of 1 mld/1 ml (according to the standard of bacterial turbidity) and applied to the surface of the dish (0.1 ml of LAB suspension can be added to the molten and cooled medium, mixed and poured into a Petri dish). Next, wells with a top diameter of 10 mm are cut out and filled with cultures of test strains (0.1 ml). A day later, the diameter of the zone of absence of bacterial growth is measured [10].

Study of acid-forming activity according to the Turner method [11].

The acid-forming activity of lactic acid bacteria and consortia was determined by the Turner method; before sowing, it is imperative to determine the acidity of milk, since there may be some deviations.

Test of adhesion of LAB

The adhesiveness of the strains was studied on formalized human erythrocytes 0 (1) (Rh+) according to the method of V. Brilis [12]. At least 100 erythrocytes were counted in at least 5 fields of view. Determined the average adhesion index (AAI), adhesion coefficient. AAI was determined by the average number of microbes attached to the surface of one erythrocyte, counting all available erythrocytes in 5 fields of view, but not less than 50 erythrocytes. Adhesion is considered no activity at AAI from 0 to 1.0, low - 1.01-2.0, medium - 2.01-4.01, high - over 4.0. The percentage of erythrocytes was calculated from the total number of erythrocytes taken into account.

Bile Tolerance

The resistance of the studied strains to bile was determined by adding a daily culture to the MPC broth medium containing 0.3% and 0.5% bovine bile. Bacterial growth was analyzed by counting viable colonies after 0, 2 and 4 hours of cultivation in agar medium at 37°C for 48 hours. pH values were adjusted to 8.0 according to experimental protocols developed for lactobacilli. In fact, the pH of bile and pancreatic juice secreted into the intestine is approximately 8.0 [13].

Tolerance to sequential action of acid and bile

Simulation of transit through the gastrointestinal tract was performed according to the method of Haller et al. [14]. Cultures were first incubated at pH 2.0-3.0 in physiological saline for 1-2 hours, then placed in 1% bile broth. The initial concentration of the microorganism culture should be 10⁷ CFU/ml

Statistical processing of results

Experiments of this study were performed in triplicate and the results developed as mean ± standard deviation (M±SD). Statistical significance was assessed by Student's $\frac{1}{4}$ s *t* test. Results are considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

10 isolates with morphologically characteristic features of LAB were isolated, namely homogeneous colonies of white or whitish-milky color, with smooth edges and a convex surface, with a sour-milk smell. After determining the viability titer (not less than 10⁷-10⁹ CFU / ml), 4

isolates and 13 collection strains of LAB of the genus *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Pediococcus* were taken for further work (Table 1).

Identification using Bruker MALDI-TOF Biotyper identified 4 isolates to the species: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*. Thus, the number of studied objects is 17 strains of LAB, including newly isolated and collectible strains.

Table 1 - Collection strains of LAB from RCM and isolated from biological samples

Strain name	Source
<i>Lactobacillus sakei</i> 24 A B-RKM 0559	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0357	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0670	B-RKM
<i>Lactobacillus casei</i> 15 LB B-RKM 0549	B-RKM
<i>Lactobacillus fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	B-RKM
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	B-RKM
<i>Lactobacillus brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0024	B-RKM
<i>Lactococcus lactis</i> B-RKM 0149	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	B-RKM
<i>Lactobacillus plantarum</i> B-RKM 0019	B-RKM
<i>L. plantarum</i> 17A	laboratory isolate
<i>L. plantarum</i> 4 A	laboratory isolate
<i>L. casei</i> Y1	laboratory isolate
<i>L. paracasei</i> 2A	laboratory isolate

Note: B-RKM - Biobank of Industrial Microorganisms of the Republican Collection of Microorganisms

Study of antimicrobial activity

One of the important factors in screening for probiotic preparations is antagonism to various pathogenic and opportunistic microorganisms.

In our studies, antagonistic activity was studied against test strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* from Biobank of Industrial Microorganisms of the RCM.

The results of the antagonistic activity are presented in Table 2. The inactive group included cultures that did not suppress test strains.

Most of the cultures showed an average value of antagonistic activity to pathogens *Streptococcus pyogenes* and *Klebsiella pneumoniae*: the width of growth inhibition zones did not exceed 9 mm. Only cultures of B-RKM 0149 (11.33 ± 0.18 mm) to *Streptococcus pyogenes* and (11.2 ± 0.3 mm) to *Klebsiella pneumoniae* showed a high degree of antagonism. Strain 2 A (12.33 ± 0.58 mm and 11.33 ± 0.4 mm, respectively).

Table 2 - Diameter of the inhibition zone (mm) caused antimicrobial activity of LAB strains against test strains microorganisms ($M \pm SD$)

Strain name	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Kl. pneumoniae</i> ,	<i>Str.s pyogenes</i>
1	2	3	4	5	6
<i>L. sakei</i> 24 A B-RKM 0559	$6,0 \pm 1^*$	$7,7 \pm 0,57$	$2,4 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,5$
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	$10,1 \pm 0,53$	$10,0 \pm 1^*$	$10,4 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,3$	$11,33 \pm 0,18$
<i>L. pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	$6,4 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,7$	$5,4 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,2$
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0357	$7,1 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,6$	0	$7,3 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,6$
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0670	$8,1 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,6$

Table 2 continuation

1	2	3	4	5	6
<i>L. casei</i> 15 LB B-RKM 0549	9,1±1,0*	6,4±0,3	3,3±1*	7,7±0,9	8,8±0,2
<i>L. fermentum</i> 9 LB B- RKM 0607	6,1±0,2	7,1±0,2	0	6,8±0,5	7,1±0,8
<i>P. pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	3,0±0	6,0±1*	3,3±0,6	5,4±0,7	6,9±0,5
<i>L. brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	3,8±0,4	6,6±0,6	0	6,4±0,3	7,8±0,7
<i>Lc. lactis</i> B-RKM 0024	8,1±0,2	5,8±1*	2,9±0,4	8,8±0,6	8,5±0,3
<i>Lc. lactis</i> B-RKM 0149	7,4±0,6	6,9±0,4	2,4±0,7	7,9±0,2	8,7±0,5
<i>L. plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	4,6±0,7	7,4±0,2	0	6,2±0,4	6,7±0,1
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0019	6,7±0,2	5,9±0,6	0	8,4±0,6	8,1±0,4
<i>L. plantarum</i> 17A	8,1±0,9	9,9±0,57	11,1±0,4	9,4±0,2	8,5±0,5
<i>L. plantarum</i> 4 A	12±1,0*	14,5±0,2	7,3±0,3	8,4±0,2	7,9±0,7
<i>L. casei</i> Y1	14,6±0,4	11,5±0,3	9,8±0,6	7,4±0,2	8,4±0,5
<i>L. paracasei</i> 2A	11±0,3	15,5±0,5	12,0±1	11,33±0,4	12,33±0,58

Note: * p<0,001; ** p<0,01; *** p<0,02; **** p<0,05

Inhibition zones: 0 mm - No activity; 1.0-4.9 mm - Weak; 5.0-8.9 mm - Moderate; ≥ 9 mm - Strong.

Antagonism indicators to *Staphylococcus aureus* were moderate in *Lc. lactis* B-RKM 0149 (10.0±1 mm), strain 17A (14.5±0.2 mm), strain Y1 (11.5±0.3 mm) and strain 2 A (15.5±0.5 mm).

The lowest indicators of antagonistic activity in all cultures were noted against *C. albicans*. For *Lc. lactis* B-RKM 0357, *L. fermentum* 9 LB B-RKM 060, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610, *L. plantarum* 5LB B-RKM 0547 and *L. plantarum* B-RKM 0019 it was completely no activity (=0). Only four cultures - isolate 2 A, isolate Y1, *Lc. lactis* B-RKM 0149 and strain 17A suppressed the growth of *C. albicans* with moderate activity.

To *Escherichia coli*, strong level of antagonistic activity were shown by *Lc. lactis* B-RKM 0149 (10.1±0.53 mm), *L. casei* 15 LB B-RKM 0549 (9.1±1.0 mm), strain 4 A (12±1.0 mm), strain Y1 (14.6±0.4 mm) and strain 2 A (11±0.3 mm). Low level activity was registered in *P. pentosaceus* 22 LB B-RKM 0598, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610, *L. plantarum* 5LB B-RKM 0547 (3.0±0 mm, 3.8±0.4 mm and 4, 6±0.7 mm, respectively).

Thus, in general, cultures have strong antagonistic activity: *Lc. lactis* B-RKM 0149, strain 17A, strain 4 A, strain Y1 and strain 2 A. Weak antagonists are *P. pentosaceus* 22 LB B-RKM 0598, *L. brevis* 4 LB B-RKM 0610. No antagonistic activity was detected against the *Candida albicans* test strain in a number of cultures.

Study of acid-forming activity

One of the best known biological properties of LAB is the ability to produce lactic acid.

Strains whose titratable acidity ranges from 20-80° T are considered inactive, and those with this indicator over 120° T are considered highly active. Table 3 below shows the indicators of the acid-forming activity of the studied strains.

The data obtained indicate a good acid-forming ability of most strains. This parameter was noted in the strains *Lactococcus lactis* B-RKM 0357, *Lactobacillus plantarum* B-RKM 0019, *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus plantarum* 17A, *Lactobacillus plantarum* 4 A.

Table 3 - The impact of bovine bile on the growth of the LAB

Strain name	Acid-forming in milk, °T	Concentration of bovine bile (%)		Average adhesion index (AAI)
		0,3	0,5	
1	2	3	4	5
<i>L. sakei</i> 24 A B-RKM 0559	73	++	++	3,8 ± 1,7**
<i>Lc. lactis</i> B-RKM 0149	119	+	+	3,5 ± 1,6
<i>L. pentosus</i> 14 LB B-RKM 0604	71	-	-	2,7 ± 1,08

Table 3 continuation

1	2	3	4	5
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0357	125	++	+	3,5 ± 1,6
<i>L. plantarum</i> B-RKM 0670	123	-	-	2,1 ± 1,08
<i>L. casei</i> 15 LB B-RKM 0549	58	-	-	2,2 ± 1,0
<i>L. fermentum</i> 9 LB B- RKM0607	40	-	-	2,4 ± 1,0
<i>P.pentosaceus</i> 22 LB B-RKM 0598	55	-	-	0,4 ± 0,23
<i>L.brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	115	+	+	1,9 ± 0,9
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0024	33	++	+	3,2 ± 1,4
<i>Lc.lactis</i> B-RKM 0149	127	+	+	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 5LB B-RKM 0547	51	-	-	3,0 ± 1,1
<i>L.plantarum</i> B-RKM 0019	120	-	-	2,8 ± 1,08
<i>L.plantarum</i> 17A	126	++	++	4,0 ± 1,98**
<i>L.plantarum</i> 4 A	128	+	-	5,8 ± 2,21***
<i>L. casei</i> Y1	145	++	++	6,6 ± 2,38***
<i>L. paracasei</i> 2A	130	++	++	4,8 ± 1,0

Note. ++ Good growth; + Visible growth; - No growth

AAI: 0-1.0 - No activity; 1.0-2.0 - Weak; 2.01-4.01 - Moderate; ≥ 4.0 - Strong. ($M \pm SD$)

Study of adhesive activity

The protective functions of lactobacilli are realized due to the adhesion of microorganisms to intestinal epithelial cells, competition for binding receptors and blockade of adhesion and colonization of mucous membranes by pathogenic and opportunistic microorganisms. Therefore, the adhesive ability of lactobacilli was investigated.

Test of the adhesiveness of strains was carried out on formalized human erythrocytes 0 (1) (Rh +) according to the method of V. Brilis. All collection strains showed the property of adhesion (table 3). 11 strains showed moderate degree, 1 strain showed a weak degree of AAI, 1 strain does not have this property. All newly isolated LAB cultures have a strong level of adhesion. The values of the adhesion index are presented in Table 3.

Tolerance of cultures to test samples simulating transit through the gastrointestinal tract

Collection cultures in the amount of 13 strains were tested for tolerance to bovine bile concentrations of 0.3% and 0.5%, 6 of them were able to grow in the presence of bile at the studied concentrations. 4 isolates are not inhibited by bile and are able to grow at all concentrations (Table 3). Thus, 10 LAB cultures are active against two concentrations of bile, which is the basis for choosing probiotic active cultures.

Simulation of transit through the gastrointestinal tract was performed according to the method of Haller et al. (2001). Acid resistance was found in 13 lactobacilli with viable cell titer from 10^4 to 10^8 CFU/ml. The bulk is made up of cultures with an indicator of GSP - 107-108 CFU / ml.

The obtained results of the tolerance of laboratory isolates to stress factors *in vitro* indicate the ability of strains of lactobacilli to survive under unfavorable conditions for them in the upper gastrointestinal tract.

Technological characteristics of LAB

We obtained consortiums based on two or more LAB. The following species of lactobacilli were selected for combinations: *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2A, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610 and 2 cultures of *Lactobacillus plantarum* (17A, 4A).

Table 4 shows the main indicators characterizing the studied strains: organoleptic properties, texture, coagulation activity, acid formation.

Following the data obtained, cultures that correspond to the main parameters were selected as starter cultures for the development of a fermented milk product. In addition, despite the weak characteristics in the process of milk fermentation, namely the activity of clot formation and acid formation, a strain of *Lactobacillus brevis* was taken into work, since the strain has a scientific and industrial foundation [8].

During the development of consortia, strains with antagonistic ability, adhesive activity and tolerance to adverse factors of the gastrointestinal tract were selected.

Table 4 - Main indicators of activity and acid formation

Strain name	Textual properties of the experimental product	Organoleptic properties of clots	Fermentation (h)	pH	Acid formation activity
<i>L. casei</i> Y1	Fermentation is excellent, the consistency is homogeneous, the viscosity is good, the taste is fermented	The color is milky, the taste is pure fermented milk	3,5-4	6,4	66°
<i>L. paracasei</i> 2A	Fermentation is good, the consistency is thick, the viscosity is medium, the taste is fermented milk	The color is milky, the taste is kefir-flavored	4-4,45	6,5	75°
<i>L. brevis</i> 4 LB B-RKM 0610	Fermentation is weak, semi-liquid consistency	The color is white, the smell is milky, the taste is slightly sour	14	5,0	102°
<i>L. plantarum</i> 4A	Fermentation is good, low viscosity, thick consistency	The color is milky, the taste is pure fermented milk	5	6,0	68°
<i>L. plantarum</i> 17A	Fermentation is good, medium viscosity, homogeneous creamy consistency	The color is milky, the taste is pure fermented milk	6	6,4	66°

In the process of creating consortium associations, the biocompatibility of the strains was considered. Biocompatibility assessment was carried out by co-cultivation on agar medium by the method of perpendicular strokes. The compatibility of strains was reported by uniform growth and the absence of inhibition zones.

During the primary selection, the following combinations of biocompatible strains of LAB were compiled: Association 1 - *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; Association 2 - *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610; *Lactobacillus paracasei* Y2; Association 3- *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* 2 A; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 4A; Association 4- *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus paracasei* A2; *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus plantarum* 17A.

For the stable state of the strains, the method of continuous cultivation was used. For this purpose, 100 ml of each culture in associations were added to sterile tubes with skimmed milk. Then the test tubes were placed in a incubator at a temperature of 37 ° and every 12 hours the cultures were transplanted into fresh milk. After each segment of cultivation, parameters such as acid formation and organoleptics were removed. Microbiological control was carried out by microscopy and the number of viable cells was calculated. Continuous cultivation was continued until a constant ratio of microorganisms belonging to the consortia was obtained.

Thus, based on a visual assessment of biocompatibility and experimental selection of the ratio of cultures, several variants were compiled (Table 5).

Table 5 - Characteristics of the obtained products in the process of milk fermentation with compiled consortia options

Associations	Textual properties of the experimental product	Organoleptic properties of clots	Fermentation (h)	pH	Acid formation activity	CFU/ml
Association 1	Good fermentation, the consistency is uniform, the viscosity is good	The color is milky, the taste is pure fermented milk with a pleasant aftertaste	4,5	3,6	70	2,8x10 ⁸
Association 2	Good fermentation, viscosity is good, dense consistency is uniform	The color is milky, the taste is pleasant sour-milk	3,5	4,0	76	4x10 ⁹
Association 3	Good fermentation, the consistency is uniform, the viscosity is satisfactory	The color is milky, sour taste	5,0	4,0	81	2x10 ⁸
Association 4	Good fermentation, medium viscosity, thick consistency	The color is milky, sour taste	5,0	4,0	107	6x10 ⁸

As a result of the studies, Association 2 was selected, which included *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A. This consortium showed the required parameters for our product and the titer of viable cells turned out to be higher than in other variants. The consortium shows the required parameters of technological characteristics, namely, it has textural properties of the final product in the form of good fermentation and viscosity, dense and homogeneous consistency, exhibits organoleptic properties corresponding to the milk color, pure fermented milk taste with a pleasant aftertaste, fermentation activity is 3.5 hours, acid formation according to the Term 90 ° C, the titer of probiotic cells is 4x10⁹ CFU/ml.

Conclusion

Strains of LAB have been studied for the presence of probiotic properties and for compliance with the main technological characteristics (organoleptic properties, consistency, coagulation activity, acid formation) as starter cultures for the development of a fermented milk product. Based on them, 4 associations of a consortium of starter cultures have been developed, taking into account the biocompatibility of strains. The consortium *Lactobacillus casei* Y1, *Lactobacillus brevis* 4 LB B-RKM 0610, *Lactobacillus paracasei* 2A showed the required parameters and was taken for inclusion in the basis of the developed drink.

Funding

This study is funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (grant № BR10764998).

References:

- 1 Kumar D., Lal M. K. Dutt S., Raigond P., Sudhakar S. et al. Functional Fermented Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics from Non-Dairy Products: A Perspective from Nutraceutical / Mol. Nutr. Food Res. 2022, 66: 2101059 (doi.org/10.1002/mnfr.202101059)
- 2 Guimarães J.T., Silva E.K., Ranadheera C.S. Effect of high-intensity ultrasound on the nutritional profile and volatile compounds of a prebiotic soursop whey beverage / Ultrason Sonochem. – 2019, 55:157-164 (doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.02.025.)
- 3 A Yelnetty and M Tamasoleng The addition of Yam Tuber (*Dioscorea alata*) flour as a source of prebiotic on biomilk synbiotic characteristics / IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2019, 247:1-6. (doi.org/10.1088/1755-1315/247/1/012052)

- 4 Balthazar C. F., Guimarães J. F. et. al The future of functional food: emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:2560–2586 (doi.org/10.1111/1541-4337.12962)
- 5 Panesar P.S., Anal A.K., Kaur R. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Opportunities, Health Benefits and Industrial Challenges / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 1-13. (doi.org/10.1002/9781119702160.ch1)
- 6 de la Rosa O., Flores-Gallegos A.C., Ascacio-Valdés J.A., Sepúlveda L., Montáñez J.C., Aguilar C.N. Fructooligosaccharides as Prebiotics, their Metabolism, and Health Benefits / In Probiotics, Prebiotics and Synbiotics (eds P.S. Panesar and A.K. Anal). 2022, 307-337 (doi.org/10.1002/9781119702160.ch13)
- 7 Grujović M. Ž., Mladenović K. G., Semedo-Lemsaddek T., Laranjo, M., Stefanović O. D., Kocić-Tanackov S. D. Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: Potential use as starters or probiotics / Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2022, 21:1537–1567 (doi.org/10.1111/1541-4337.12897)
- 8 Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Li K., Shaikhin S, Saduakhassova S, Kushugulova A, Marotta F. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods / Asian J. Applied Sci. – 2016, 9(143-158) (doi: 10.3923/ajaps.2016.143.158)
- 9 Schulthess B., Bloemberg G.V., Zbinden R., Böttger E.C., Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory / Journal of clinical microbiology. 2014, 52(1089-1097)
- 10 Sarmurzina Z., Bissenova G., Zakarya K. et al. Characterization of probiotic strains of lactobacillus candidates for development of synbiotic product for kazakh population / Journal of Pure and Applied Microbiology, 2017, 11(151–161)(doi.10.22207/JPAM.11.1.20)
- 11 General pharmacopoeial article «Determination of the specific activity of probiotics: OFS. 1.7.2.0009.15». - [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIIIth ed.]. - T. II. -P. 24. (in Russ.).
- 12 Brilis, V.I., Brilene, T.A., Lentsner, K.P., Lentsner, A.A. Method of studying the adhesive process of microorganisms / Laboratornoe delo, 1986, 4(210–212).
- 13 Genci G., Trotta F., Galdini G. Ustoychivost' spor i vegetativnykh kletok *Bacillus clausii* k probam, imitiruyushchim tranzit po zheludochno-kishechnomu traktu / Zdorov'ye Ukrainy. – 2008, 19/1(57-59)
- 14 Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C. and Hammes, W.P. (2001) Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. Syst Appl Microbiol 24(218–226)(doi.org/10.1078/0723-2020-00023)

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Плата за публикацию статей не взимается.

Представленные для опубликования материалы должны удовлетворять следующим требованиям:

Содержать результаты оригинальных научных исследований по актуальным проблемам в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии, ранее не опубликованные и не предназначенные к публикации в других изданиях.

Все статьи принимаются и публикуются одновременно на двух языках (казахском и английском, или русском и английском).

Статьи принимаются в электронном виде (в формате .doc, .docx либо .rtf) через профиль автора на сайте imv-journal.kz.

При невыполнении формальных требований, статья к публикации не принимается.

Статьи, поступившие в редакцию журнала, могут быть проверены с помощью системы Антиплагиат. В случае, если результат проверки выявляет некорректно оформленные заимствования, статья может быть отклонена.

При выполнении формальных требований, статья направляется на рассмотрение членам редколлегии, имеющим ученую степень в научной области, соответствующей содержанию статьи. При этом редакция определяет соответствие статьи профилю журнала, требованиям к оформлению. При соответствии вышеуказанным требованиям направляет ее на рецензирование стороннему специалисту, обладающему высокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению, имеющему ученую степень PhD, доктора или кандидата наук.

К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в одном отделе или департаменте учреждения, где выполнена работа. Рецензент выносит решение о возможности опубликования

Окончательное решение о целесообразности публикации принимается Редакционной коллегией в соответствии с рекомендациями рецензентов.

После принятия Редакционной коллегией решения о допуске статьи к публикации ответственный редактор журнала информирует об этом автора и указывает сроки публикации.

1. Присланные материалы должны содержать:

- Материалы статьи (файлу со статьей присваивается имя по фамилии первого автора).
- Сведения об авторах (фамилия, имя, отчество, ученая степень, звание, должность, место работы, контактные телефоны, электронные адреса (e-mail), идентификационный номер (ORCID)).
- Отсканированное сопроводительное письмо.

2. Статья должна содержать:

- МРНТИ – межгосударственный рубрикатор научно-технической информации
- Фамилии авторов статьи (прописными буквами, инициалы следуют перед фамилией);
- Название организации, в которой была выполнена работа и город (строчными буквами);

- Название статьи (прописными буквами полужирным шрифтом);
- Аннотация (в начале статьи перед основным текстом);
- Ключевые слова (не более 7);
- Введение (без заголовка), в котором кратко излагается актуальность и новизна рассматриваемого вопроса;
- Основной текст (включает материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, содержащее краткое изложение основных результатов работы);
- Список литературы (оформляется с указанием фамилии и инициалов автора, полного названия книги (статьи), места издания, названия журнала (года, тома, номера, страницы).

3. Размер одной статьи не должен превышать 5-7 машинописных страниц (статьи обзорного характера – до 15 стр.), включая аннотацию, таблицы, рисунки, список литературы. В том же файле следует представлять резюме на трех языках (казахском, русском и английском).

4. Статья должна быть набрана на компьютере в редакторе MS Office Word, шрифтом Times New Roman 12 пт, с пробелом между строк 1 компьютерный интервал, поля – верхнее и нижнее 2 см, левое 3 см, правое 1,5 см. Количество рисунков – не более пяти. Аннотация, таблицы, рисунки, список литературы – 11 пт через 1 компьютерный интервал. Ссылки на литературные источники даются цифрами в прямых скобках по мере упоминания и должны быть идентичными на двух языках. Необходимо тщательно следить за точным соответствием обозначений в тексте и на таблицах, рисунках и др. При изложении экспериментального материала должна быть использована международная система единиц (СИ).

5. После статьи на английском языке приводится список литературы в романском алфавите (References) для SCOPUS и других БАЗ ДАННЫХ полностью отдельным блоком, повторяя список литературы к русскоязычной части, независимо от того, имеются или нет в нем иностранные источники. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите (латиница).

В References не используются разделительные знаки («//» и «–»). Название источника и выходные данные отделяются от авторов типом шрифта, чаще всего курсивом, точкой или запятой.

На сайте <http://www.translit.ru/> можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу, используя различные системы. Программа очень простая, ее легко использовать для готовых ссылок. К примеру, выбрав вариант системы Библиотеки Конгресса США (LC), получаем изображение всех буквенных соответствий. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

6. Статьи, не соответствующие Правилам, не публикуются и не возвращаются автору. Редакция оставляет за собой право производить сокращения и правки статей.

