



2023

ISSN 2304-585X
ИНДЕКС 76057

Microbiology and virology МИКРОБИОЛОГИЯ және



ВИРУСОЛОГИЯ

№1(40)

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

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

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

№ 1(40)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТАЫ
2023

ISSN 2304-585 X

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

№ 1(40)/2023

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)

Баймаханова Б.Б. – кандидат биологических наук

Айткельдиева С.А. – доктор биологических наук

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

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

Науanova 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

Кузметов А.Р. (Узбекистан) – доктор биологических наук, профессор

Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор

Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

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**

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай,

Г.Ж. Абдиева, М.Е. Елубаева

Роль эндофитных микроорганизмов в повышении устойчивости растений в условиях солевого стресса6

А.К. Саданов, Ж.Б. Сулейменова, Э.Т. Исмаилова,

О.Н. Шемшура, Б.Б. Баймаханова, Г.Б. Баймаханова,

Н.А. Бисько, А.Е. Молжигитова, А.Е. Елубаева,

Д.А. Тлеубекова

Бактериальный ожог плодовых культур35

М.Х. Нармуратова, А. Байдуллаева,

А.Е. Муратбекова, Д.М. Мазбаева,

Ж.Б. Нармуратова

Описание свойства лактоферрина молока как иммуномодулятора против возбудителя коронавируса...59

А.Д. Масирбаева, А.Ш. Сайфудин, Б.К. Амирашева,

С.Д. Жантлесова, М.Б. Ерденбекова, Ш. Талапбек,

А.М. Байсариеva

Клиническое применение пробиотиков и пребиотиков...72

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И.С. Коротецкий, Т.В. Кузнецова, О.Н. Рева,

Л.Н. Иванова, Н.В. Зубенко, Р.А. Паренова, С.В. Шилов

Анализ качественного и количественного разнообразия виromы кишечника мышей после лечения лекарственно-устойчивой пневмонии координационным соединением...94

Г.Ж. Ещанова, Н.А. Утарбаева, А.К. Калиева,

Б. Бақытжанқызы, Н.А. Кемалова

Вермикомпостирование биогумуса с помощью калифорнийского червя *Eisenia fetida* и применение биогумуса в сельском хозяйстве.....109

А.К. Саданов, Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова,

С.Э. Оразымбет, Е.Ж. Шорабаев, Ж.Т. Мусабеков,

Р.Ж. Кантагай, Л.Е. Протасюк, Л.А. Кошелева,

С.Б. Джайлуюва

Ассоциация бактерий для производства лекарственного пробиотического препарата с широким спектром антимикробного действия.....116

А.Б. Алтекей, А.А. Сапарбекова, Е.А. Олейникова,

А.А. Сейтмагзимов, А.Ш. Мамбаева

Биодеградация лигнина соломы культурой гриба *Scizophyllum commune*, выделенной с поверхности дерева.....127

Ә.Т. Ахметкерим, Д.К. Кирбаева, А.К. Садвакасова,

Б.К. Заядан, Н.Р. Акмуханова, М.О. Бауенова,

Ф.К. Сарсекеева

Влияние концентрации соли на рост и продуктивность штамма микроводорослей *Scenedesmus obliquus* sp. B7.....146

С.А. Надирова, Ю.А. Синявский, Ж.Т. Лесова,
Б.Н. Алибаева, Ж.Б. Дәрменқұлова
Влияние пробиотической закваски на процесс сквашивания
йогуртов.....159

К.Т. Адилова, Э.К. Асембаева, К.А. Мырзабек,
А.Е. Рябова, З.Ж. Сейдахметова, М. Илиясызы
Исследование качества синбиотического кисломолочного
продукта с изомальтом.....172

В.Ю. Сущих, М.Р. Юсупов, Б. Канатов, С.М. Дюсенов,
А.А. Каримов
Эпизоотологический и микробиологический мониторинг
почвенных сибиреязвенных очагов, расположенных в
акмолинской области.....180

С.Ш. Нуралибеков, Т.Б. Сабыржан, Е.Т. Касымбеков,
Н.Н. Ахметсадыков, М.Н. Ахметжанова, Ж.М. Батанова,
Е.Я. Хан, К.О. Карамендин, А.И. Кыдырманов
Серологический мониторинг циркуляции вируса гриппа А в
популяции лошадей южного Казахстана.....192

С.Н. Сейілбек, М. Тортай, Н. Р. Акмуханова,
Ф.К. Сарсекеева, Д.К. Кирбаева, Н.Е. Бидагұлова,
Н.А. Алтыбаева, А.Б. Еламанова
Биоразнообразие микроводорослей посевных площадей
ақдалинского массива и выделение цианобактерии с
антибактериальной активностью.....211

С.Т. Даугалиева, А.Т. Даугалиева, А.И. Ашанин, Б.Б. Ергали
Влияние рациона на продуктивность бычков казахской
белоголовой породы и концентрацию архей в микробиоме
желудочно-кишечного тракта221

МАЗМҰНЫ

CONTENTS

ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

- М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай, Г.Ж. Абдиева, М.Е. Елубаева
Тұзды стресс жағдайында өсімдіктердің төзімділігін арттырудагы эндофитті микроорганизмдердің ролі.....21

- А.К. Саданов, Ж.Б. Сулейменова, Э.Т. Исмаилова, О.Н. Шемшуря, Б.Б. Баймаханова, Г.Б. Баймаханова, Н.А. Бисько, А.Е. Молжигитова, А.Е. Елубаева, Д.А. Тлеубекова
Жеміс дақылдарының бактериялық күйік ауруы.....41

- М.Х. Нармуратова, А. Байдуллаева, А.Е. Мурагбекова, Д.М. Мәзбаева, Ж.Б. Нармуратова
Коронавирус көздірғышына қарсы иммуномодуляциялық агент ретінде сүт лактоферринің қасиетін сипаттау.....47

- А.Д. Масирбаева, А.Ш. Сайфудин, Б.К. Амирашева, С.Д. Жантлесова, М.Б. Ерденбекова, Ш. Талапбек, А.М. Байсариева
Пробиотиктер мен пребиотиктерді клиникалық қолдану.....78

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

- И.С. Коротецкий, Т.В. Кузнецова, О.Н. Рева, Л.Н. Иванова, Н.В. Зубенко, Р.А. Паренова, С.В. Шилов
Дәрі-дермектерге төзімді пневмонияны координациялық қосылыспен емдегеннен кейін тышқандардың ішек вирусының сапалық және сандық әртүрлілігін талдау.....93

- Г.Ж. Ешчанова, Н.А. Утарбаева, А.К. Калиева, Б. Бақытжанқызы, Н.А. Кемалова
Калифорниялық шылаушын *Eisenia foetida* көмегімен биогумус өндіру және оны егіншілікте қолдану.....104

- А.К. Саданов, Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова, С.Э. Оразымбет, Е.Ж. Шорабаев, Ж.Т. Мусабеков, Р.Ж. Каптагай, Л.Е. Протасюк, Л.А. Кошелева, С.Б. Джайлұяуова
Микробқа қарсы әсерінің кең спектрі бар дәрілік пробиотикалық препаратты өндіруге арналған бактериялар қауымдастыры.....121

- А.Б. Алтекей, А.А. Сапарбекова, Е.А. Олейникова, А.А. Сейтмагзимов, А.Ш. Мамбаева
Ағаш бетінен оқшауланған *Schizophyllum commune* саңырауқұлагының дақылымен сабан лигнинің биодеградациясы.....132

- Ә.Т. Ахметкерим, Д.К. Кирбаева, А.К. Садвакасова, Б.К. Заядан, Н.Р. Акмұханова, М.О. Бауенова, Ф.К. Сарсекеева
Микробалдыр *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штамының есуі мен өнімділігіне тұз концентрацияларының әсері139

REWIEW RESEARCH PAPERS

- M.G. Saubenova, YE.A. Oleinikova, ZH.N. Yermekbay, G. Zh. Abdieva , M.Y. Yelubaeva
The role of endophytic microorganisms in increasing plant resistance under salt stress.....21

- A.K. Sadanov, Z.B. Suleimenova, E.T. Ismailova, O.N. Shemshura, B.B. Baimakhanova, G.B. Baimakhanova, N.A. Bisko, A.E. Molzhigitova, A.E. Yelubayeva, D.A. Tleubekova
Fire blight of fruit crops.....41

- M.Kh. Narmuratova, A. Baydullaeva, A.E. Muratbekova, D.M. Mazbayeva, Zh.B. Narmuratova
Description of the properties of milk lactoferrin as an immunomodulator against the coronovirus causes.....60

- A.D. Massirbaeva, A.S. Saifudin, B.K. Amirasheva, S.D. Zhantlessova, M.B. Yerdenbekova, Sh. Talapbek, A.M. Baisariyeva
Clinical use of probiotics and prebiotics79

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

- I.S. Korotetskiy, T.V. Kuznetsova, O.N. Reva, L. Ivanova, N. Zubenko, R. Parenova, S.V. Shilov
Analysis of the qualitative and quantitative diversity of mouse intestinal virome after treatment of drug-resistant pneumonia with a coordination compound.....85

- G.Zh. Eshchanova, N.A. Utarbayeva, A.K. Kalieva, B. Bakytzhankzy, N.A. Kemalova
Vermicomposting of biohumus with the californian worm *Eisenia foetida* and its use in agriculture.....110

- A.K. Sadanov, N.N. Gavrilova, I.A. Ratnikova, S.E. Orazymbet, E.Zh. Shorabaev, Zh.t. Musabekov, R.Zh. Kaptagai, L.E. Protasiuk, L.A. Kosheleva, S.B. Dzhailauova
Bacteria association for the production of a therapeutic probiotic drug with a wide spectrum of antimicrobial action.....122

- A.B. Altekey, A.A. Saparbekova, Y.A. Oleinikova, A.A. Seitmagzimov, A.Sh. Mambayeva
Biodegradation of straw lignin by culture of the fungus *Schizophyllum commune* isolated from the tree surface133

- A.T. Akhmetkerim, D.K. Kirbayeva, A.K. Sadvakasova, B.K. Zayadan, N.R. Akmukhanova, M.O. Bauanova, F.K. Sarsekeyeva
The effect of salt concentration on the growth and productivity of microalgae strains *Scenedesmus obliquus* sp. B7.....146

C.А. Надирова, Ю.А. Синявский, Ж.Т. Лесова, Б.Н. Алибаева, Ж.Б. Дәрменқұлова Пробиотикалық ұйытқылардың йогурттың ашу процесінә әсері.....	S.A. Nadirova, Yu.A. Sinyavskiy, Zh.T. Lessova, B.N. Alibayeva, Zh.B. Darmenkulova The effect of probiotic starter culture on the fermentation process of yogurt.....
K.Т. Әділова, Э.К. Асембаева, К.А. Мырзабек, А.Е. Рябова, З.Ж. Сейдахметова, М. Илиясқызы Изомалт қосылған синбиотикалық сүтқышқылды өнімнің сапасын зерттеу.....	K.T. Adilova, E.K. Asembayeva, K.A. Myrzabek, A.E. Ryabova, Z.Zh. Seidakhmetova, M. Iliyaskyzy Study of the quality of a symbiotic fermented milk product with isomalt.....
V.Ю. Сущих, М.Р. Юсупов, Б. Канатов, С.М. Дюсенов, А.А. Каримов Ақмола облысында орналасқан сібір жарасының топырақ ошактарына эпизоотологиялық және микробиологиялық мониторинг жүргізу.....	V.Yu. Suchshikh, M.R. Yusupov, B. Kanatov, S.M. Dyusenov, A.A. Karimov Epizootological and microbiological monitoring of soil anthrax foci located in akmola region.....
C.Ш. Нуралибеков, Т.Б. Сабыржан, Е.Т. Касымбеков, Н.Н. Ахметсадыков, М.Н. Ахметжанова, Ж.М. Батанова, Е.Я. Хан, К.О. Карамендін, А.И. Қыдырманов Оңтүстік Қазақстандағы жылқылар арасындағы А тұмау вирусы айналымына серологиялық мониторинг жүргізу	S.Sh.nuralibekov, T.B. Sabyrzhan, Ye.T. Kassymbekov, N.N. Akhmet sadыkov, M.N. Akhmetzhanova, Zh.M. Batanova, Ye.Ya. Khan, K.O. Karamendin, A.I. Kydyrmanov Serological monitoring of influenza A virus circulation among horses of Southern Kazakhstan.....
C.Н. Сейілбек, М. Тортай, Н. Р. Акмұханова, Ф.К. Сарсекеева, Д.К. Кирбаева, Н.Е. Бидагұлова, Н.А. Алтыбаева, А.Б. Еламанова Ақдала егіс алқаптарының микробалдырлар биональтурлілігі және бактерияларға қарсы белсенділігі бар цианобактерияларды бөліп алу.....	S.N. Seilbek, M. Tortay, N. R. Akmukhanova, F.K. Sarsekeeva, D.K. Kirbaeva, N.E. Bidagulova, N.A. Altybaeva, A.B. Elamanova Biodiversity of microalgae of acreage of the akdala valley and isolation of cyanobacteria with antibacterial activity.....
C.Т. Даугалиева, А.Т. Даугалиева, А.И. Ашанин, Б.Б. Ерғали Зығыр тұқымымен азықтандырудың қазақтың ақбас тұқымы бұқашықтарының асқазан-ішек жолы микробиомасындағы архейлердің өнімділігі мен шоғырлануына әсері.....	S.T. Daugalyieva, A.T. Daugalyieva, A.I. Ashanin, B.B. Yergali Influence of the diet on the productivity of the Kazakh white head steers and concentration of archaea in the gastrointestinal tract microbiome.....

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.27.51, 34.27.23, 68.03.07

М.Г. САУБЕНОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА¹, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1*}, Г.Ж. АБДИЕВА²,
М.Е. ЕЛУБАЕВА¹

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

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: zhan98_14@mail.ru

РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.01

Аннотация

Засоление, в том числе связанное с засухой, вызывает потерю урожайности растений до 60%. В борьбе с абиотическими стрессами все большее значение приобретает применение эндофитов, колонизирующих растения и повышающих их способность противостоять различным повреждающим воздействиям. Микроорганизмы, способствующие росту растений, восстанавливают метаболические нарушения в растениях, стимулируя их рост, защищая от стрессовых воздействий, восстанавливая и сохраняя физиологические процессы. Подчеркивается, что отбор, скрининг и применение устойчивых к стрессу микроорганизмов является оптимальным вариантом, помогающим преодолеть ограничения продуктивности сельскохозяйственных культур в районах, подверженных абиотическим стрессам. В обзоре приводятся научные данные, касающиеся стратегии смягчения стресса, опосредованной микробами, с учетом молекулярных, биохимических, физиологических и ультраструктурных параметров с использованием различных омических подходов, способствующих пониманию механизмов микробных взаимодействий и биохимических путей накопления и усиления различных метаболитов, белков, ферментов, а также повышения и понижения регуляции различных генов. Показана роль бактерий, грибов и их сочетаний в обеспечении растений питательными веществами, в защите растения-хозяина от стрессов окружающей среды.

Ключевые слова: эндофиты, абиотический стресс, солеустойчивость.

Около 96,5% сельскохозяйственных земель в мире подвержено абиотическим стрессам [1]. Наиболее серьезный из них связан с засухой и засолением, поскольку он влияет на биоразнообразие и состав почвы, ухудшает состояние растений, влияет на их продуктивность, вызывая потери урожая до 60% [1-4].

В борьбе с повреждающим воздействием абиотических факторов, наряду с традиционными способами использования более устойчивых сортов культурных растений, все большее значение приобретает применение эндофитных микроорганизмов, повышающих способность растений противостоять различным повреждающим воздействиям [5,6]. Микроорганизмы, способствующие росту растений (PGPR), восстанавливают метаболические нарушения в растениях, стимулируя их рост, защищая от стрессовых воздействий, восстанавливая и сохраняя физиологические процессы. В настоящее время не подлежит сомнению, что использование микроорганизмов является серьезной альтернативой традиционным методам ведения сельского хозяйства в качестве средства, обеспечивающего устойчивый рост растений, повышение урожайности и защиту растений, а, следовательно, устойчивое производство продуктов питания и поддержание продовольственной безопасности. Однако в полевых условиях успех их применения пока

остается невысоким, потому необходимо углубить исследования в области создания подходящих и жизнеспособных составов PGPR для крупномасштабных сельскохозяйственных применений.

Недавние разработки в области метаболомики позволили провести подробный и всесторонний анализ метаболома и метаболических нарушений в растениях из-за изменений окружающей среды и, в первую очередь, трехсторонних взаимодействий между растениями, PGPR и патогенами [7]. Высказано также мнение, что из-за ограничений в отношении поддержания жизнедеятельности микроорганизмов в различных стрессовых условиях, целесообразно использовать их метаболиты, способствующие смягчению стресса независимо от экологических ситуаций [8]. Такой технологический подход в настоящее время набирает популярность среди исследователей, стремящихся дополнить и решить ключевые проблемы, связанные с использованием микроорганизмов для ускорения роста растений. Его преимуществом является меньшая подверженность химических соединений воздействию солевого стресса, небольшие дозы применения и простота хранения, в сравнении с живыми микроорганизмами [9]. Однако такой подход не учитывает возможность воспроизведения микробных клеток в естественных условиях и снижения потребности в повторных воздействиях. Тем не менее оба подходы могут быть перспективны в зависимости от обстоятельств.

Реакция растений на стресс засоления.

Неблагоприятные условия среды вынуждают растения вырабатывать специфические адаптивные реакции, способствующие приспособлению (акклиматизации) к ним, включающие развитие морфологических и физиологических признаков, помогающих росту в изменившихся условиях. Обычной реакцией галофитов на засоление почвы является компартментализация токсичных ионов в вакуолях и накопление в цитоплазме для осмозащиты совместимых растворенных веществ, таких как сахара и полиолы, а также пролин или глицин-бетаин, напрямую стабилизирующих белки и мембранные структуры в условиях дегидратации и защищающих клетки от окислительного стресса. При этом аминокислоты и органические кислоты способствуют поддержанию градиента водного потенциала от почвы к растениям, в то время как сахара участвуют в регулировании осмотического давления [10].

В обеспечении клеточного гомеостаза особое вниманиеделено роли пролина, используемого для компенсации клеточного дисбаланса, вызванного экологическим стрессом. Широкое использование в природе пролина в качестве молекулы-адаптера стресса указывает на то, что он играет фундаментальную биологическую роль в реакции на стресс. Пролин и растворимые сахара являются осмозащитными молекулами, которые накапливаются в ответ на различные факторы экологического стресса, включая засуху [11], и уменьшают ущерб, вызванный окислительным стрессом [12]. Пролин может действовать как сигнальная молекула, модулирующая функции митохондрий, влияющая на пролиферацию или гибель клеток и вызывающая экспрессию специфического гена, что может иметь значение для восстановления растений после стресса [13].

В последние годы особое внимание стало уделяться мелатонину [14], связанному с абиотическими стрессами, такими как засуха, радиация, экстремальные температуры и химические стрессы. Экзогенно применяемый мелатонин также может улучшить способность растений переносить абиотические стрессы.

Показано, что фенотипические изменения, позволяющие растениям выдерживать стрессовые ситуации, могут положительно модулироваться симбиотическими микроорганизмами [15].

Микроорганизмы, способствующие росту растений (PGPR).

Метаболические и генетические возможности микроорганизмов делают их подходящим оружием для борьбы с экстремальными условиями окружающей среды. Их взаимодействие с растениями вызывает различного рода локальные и системные реакции, повышающие способность растений бороться с абиотическими стрессами [16].

Свидетельством важных свойств микробных взаимодействий с растениями является значительное количество накапливающихся данных, которые предполагают наличие глубоких механизмов, основанных на взаимодействиях растений и микробов, модуляции клеточных, биохимических и молекулярных механизмов, связанных с устойчивостью к стрессу.

Многочисленными исследованиями установлено, что обязательное присутствие микроорганизмов-эндофитов непатогенной природы во всех без исключения растениях, их способность улучшать доступ растений к питательным веществам почвы и повышать устойчивость к стрессам различной природы, обеспечивает возможность как самого существования растений, так и повышения их урожайности [17,18]. Показано, что даже при выращивании в одной и той же почве разнообразные виды растений содержат различные микробиологические сообщества [19].

Независимо от содержания воды, PGPB обеспечивают растения питательными веществами и улучшают условия окружающей среды для их непрерывного роста. PGPB играют жизненно важную роль, за счет увеличения содержания азота, фосфора, железа и т. д., защищают растение-хозяин от стрессов окружающей среды и помогают смягчить антагонистические эффекты стресса [20]. PGPR обладают способностью синтезировать гормоны, стимулирующие рост и развитие растений в условиях стресса. Они снижают антиоксидантную активность, а также увеличивают выработку пролина, свободных аминокислот и сахара в растениях [21]. Кроме того, PGPB используют и такие механизмы влияния на физиологические, биохимические и молекулярные реакции, помогающие растениям справляться с солевым стрессом, как синтез экзополисахаридов, защищающих растительные клетки от потери воды и стабилизирующих агрегаты почвы [22]; синтез антиоксидантных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза и пероксидаза), предотвращающих вредное воздействие активных форм кислорода; синтез антибиотиков, защищающих ослабленные стрессом растения от почвенных патогенов; синтез фермента, снижающего уровень этилена в растениях, что уменьшает вызванное стрессом старение растений, снижение абсорбции избыточных питательных веществ / тяжелых металлов; индукция генов устойчивости к абиотическому стрессу. При этом наиболее успешные PGPB обладают несколькими из этих механизмов [23].

Показано, что стимулирование роста растений, в том числе чувствительных к соли, может быть обеспечено солеустойчивыми (галофильными) ризобактериями, выделенными из засоленных почв [24-25].

Бактерии. Многочисленными исследованиями установлено, что толерантность различных культур растений к солевому стрессу можно повысить с помощью таких экзогенных биостимуляторов как ризобактерии [26,27], способствующие улучшению прорастания семян, одновременному увеличению биомассы и продуктивности растений [28,29]. Кроме того, PGPR могут быть использованы в технике биозагрузки семян, поскольку этот подход демонстрирует многообещающие возможности для повышения их жизнеспособности, быстрого прорастания и однородности роста проростков [30].

Систематический и углубленный обзор текущего состояния эндофитного бактериального разнообразия, стратегии колонизации ими растений и их благотворного воздействия на устойчивое сельское хозяйство за счет сокращения и/или отказа от использования токсичных агрохимикатов, а также в качестве защитных агентов против болезней растений и для повышения урожайности сельскохозяйственных культур представлен в обзоре Morales-Cedeño с соавторами [31]. Показано, что бактерии с атрибутами PGP являются ключевыми компонентами почвы, способными устанавливать полезные ассоциации с растениями [32]. Их наиболее изученные представители описаны в работах Yadav с соавторами [33] и Kour с соавторами [34].

В состав микроорганизмов, способствующих росту растений, входят различные роды *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia* и *Azotobacter* [22]. Среди *Firmicutes* выделяется род *Bacillus*, являющийся важным

ресурсом для изучения галофильных ферментов и метаболических путей для ремедиации загрязнителей в засоленной почве [35]. Наиболее распространенные и изученные эндофитные бактерии относятся к *Proteobacteria*, *Firmicutes*, а также *Actinobacteria*. Доминирующими среди них у большинства бобовых и не бобовых растений являются *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Burkholderia*, *Rhizobium* и *Klebsiella*. Большинство PGPR включают различные штаммы видов *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Rhizobium* [36, 37].

Среди наиболее изученных в этом плане ризобактерий - бациллы, способные к производству целого ряда биологически активных веществ, благотвенно действующих на растения, способность которых образовывать споры помогает выживанию в неблагоприятных условиях. При недостатке воды в почве, повышении ее солености, а также накоплении солей тяжелых металлов, метаболиты этих организмов (в том числе экзополисахариды и сидерофоры) предотвращают движение токсичных ионов, регулируют ионный баланс и транспорт воды в растительных тканях, одновременно контролируя популяции патогенов. Синтезируемые ими индол-3-уксусная кислота, гибберелловая кислота и 1-аминоциклогексан-1-карбоксилат дезамина регулируют внутриклеточный метаболизм фитогормонов и повышают устойчивость растений к стрессу. Бациллы, продуцирующие дезаминаzu, имеют преимущества в качестве биоинокулянтов для решения проблемы засоления сельскохозяйственных почв [38]. Ассоциация с бациллами стимулирует иммунитет растений к стрессам, изменяя чувствительные к стрессу гены, белки, фитогормоны и родственные метаболиты. Вещества, разрушающие клеточные стенки из *Bacillus spp.* могут наносить ущерб патогенным бактериям, грибам, нематодам, вирусам и другим вредителям, контролируя их популяции на растениях. Штаммы *Bacillus* выделяют кислые метаболиты, растворяющие различные соединения минералов, а также полисахариды, адсорбирующие силикаты [39]. Инокуляция *B. subtilis* улучшала питание растений сахарного тростника и концентрацию в них хлорофилла. В результате даже в условиях засухи улучшались параметры газообмена (особенно скорость нетто-фотосинтеза и эффективность использования воды). Кроме того, у инокулированных растений снижались параметры, характеризующие стресс (активность антиоксидантного метаболизма), что приводило к увеличению роста корней, кущению, увеличению массы стеблей и повышению концентрации сахарозы в стеблях [40]. В обзоре Lopes и др. [41] подчеркивается, что эндофитные виды *Bacillus* как продуценты биологически активных соединений, представляющих биотехнологический интерес, являются ценным многофункциональным набором инструментов, который можно интегрировать с методами управления растениеводством для достижения более высокой урожайности.

Наиболее изученными представителями рода, применяющимися в сельском хозяйстве, являются *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, хотя другие виды также продемонстрировали большой потенциал [41, 2]. В статье Aloo с сотрудниками [42] рассматриваются уникальные свойства *B. rhizobacteria*, а также различные механизмы их воздействия, практическое использование которых может способствовать устойчивости сельского хозяйства. Продемонстрирована решающая роль *B. firmus* SW5 в смягчении неблагоприятного воздействия высокой засоленности на рост и продуктивность сои за счет изменения архитектуры корневой системы и индукции систем антиоксидантной защиты, а также экспрессии чувствительных к стрессу генов [43]. Эти организмы известны также как отличные фосфатсолюбилизаторы [44].

Большое значение в повышении устойчивости растений в сухой и соленой окружающей среде имеют штаммовые различия микроорганизмов. Так, при исследовании бактериального сообщества эндофитов пяти видов растений, произрастающих в пустыне Тар в Пакистане, были отобраны штаммы *Bacillus*, обладающие устойчивостью к солевому и тепловому стрессу, а также антимикробной активностью. При их тестировании на растении *Arabidopsis thaliana*, не являющихся хозяином, было показано, что *B. cereus* РК6-

15, *B. subtilis* PK5-26 и *B. cylindracea* PK3-109 значительно усиливали его рост в условиях солевого стресса, удваивая уровни свежей массы по сравнению с неинокулированными растениями. Другие штаммы не способствовали росту растений в нормальных условиях, но увеличивали свежую массу растений более чем на 50% по сравнению с неинокулированными растениями в условиях солевого стресса.

Исследование штамма *B. amylolyticus faciens*, выделенного из эндоризосферы *Sasamorpha borealis*, показало, что его применение в стрессовых условиях улучшило выживаемость инокулированных растений перца [45]. Они сохраняли высокое содержание хлорофилла, салициловой кислоты, сахара, аминокислот и пролина и демонстрировали низкий метаболизм липидов, абсцисовую кислоту, белок, содержание перекиси водорода и антиоксидантную активность как в условиях засоления и засухи, так и под действием тяжелых металлов. Показано также, что *B. amylolyticus faciens* GJ1 может улучшить иммунитет цитрусовых за счет увеличения фотосинтеза и усиления экспрессии генов, связанных с устойчивостью [46]. В исследовании Lim и Kim [47] растения стручкового перца, обработанные штаммом *B. licheniformis*, достигли больших показателей длины побегов и сухого веса, а также более высокие уровни экспрессии четырех генов, связанных с засухой и холодовым стрессом. Показано, что обработка нута *B. subtilis*, *B. thuringiensis* и *B. megaterium* вызывает в растениях метаболические и физиологические изменения, уменьшающие воздействие засухи [2]. При культивировании нута в контролируемых условиях засухи накапливаются пролин, L-аргинин, L-гистидин, L-изолейцин и триптофан и индуцируется значительное накопление рибофлавина, L-аспарагина, аспартата, глицерина, никотинамида и 3-гидрокси-3-метилглутарата. Полученные данные показывают, что эндофитные штаммы *Bacillus* представляет собой важный геномный ресурс для расшифровки вопросов стимулирования роста растений на молекулярном уровне [48].

Для использования в качестве эффективных фитостимуляторов, биоудобрений и агентов биоконтроля рассмотрены также многочисленные виды *Paenibacillus* [49]. Описаны механизмы, используемые этими бактериями для повышения биодоступности и / или облегчения усвоения питательных веществ растением-хозяином, модуляции гормонов растений, стимуляции защиты организма-хозяина и механизмов устойчивости к стрессу, оказания антагонистического действия против патогенов и смягчения последствий их воздействия на здоровье растений. Всестороннее и систематическое изучение механизмов их действия в сочетании с полевыми исследованиями может помочь в поиске и выборе эффективного биоудобрения и агента биоконтроля.

Известно также, что и другие почвенные бактерии, такие как *Pseudomonas* и *Azospirillum*, снимают абиотические стрессы у многих видов сельскохозяйственных культур, включая рис [50]. Так, растения сои, инокулированные *P. putida* H-2-3, снижали засоление и стресс от засухи за счет увеличения содержания хлорофилла, увеличения длины и биомассы побегов, повышения содержания абсцисовой и салициловой кислот, полифенола, флавоноидов, супероксиддисмутазы и 2,2-дифенил-1-пикрила - гидразилгидрат поглощающей активности [51].

Ризобактерии, в частности, *Enterobacter sp.* S16-3 и *Pseudomonas sp.* C16-2O, могут колонизировать поверхность корней растений и смягчать эффект солевого стресса, обеспечивая их азотом, фосфатами и калием, а также фитогормонами, такими как ауксин, цитокинин и абсцисовая кислота. За счет инокуляции этими бактериями снижалось содержание малонового диальдегида, H_2O_2 и повышались показатели антиоксидантной способности, содержания пролина и антиоксидантных ферментов [52].

При инокуляции двух сортов кукурузы *Burkholderia phytofirmans* в стрессовых условиях засухи двумя штаммами бактериальных эндофитов *Pseudomonas* (PsJN) и *Enterobacter sp.* FD17 Naveed с сотрудниками [53] показали, что бактериальная инокуляция минимизировала вызванные засухой эффекты стресса, значительно увеличивая биомассу побегов и корней, площадь листьев, содержание хлорофилла, фотосинтез и

фотохимическую эффективность. Аналогичным образом, бактериализованные проростки показали более высокое относительное содержание воды в листьях (30%) по сравнению с контролем, тогда как у неинокулированных растений при стрессе засухи наблюдалось на 43% более высокое повреждение листьев.

Тестирование *in vitro* 44 бактериальных изолятов позволило выделить четыре изолята с высокими показателями солеустойчивости [54]. Среди них *B. subtilis* и *P. pseudoalcaligenes* продемонстрировали активность дезаминазы, выработку сидерофоров и индолуксусной кислоты. Они способствовали индукции устойчивости сои к стрессу засоления в гидропонике, увеличивая биомассу растений, относительное содержание воды и осмолитиков в побегах и корнях. Концентрация Na^+ в растениях сои, обработанных *P. pseudoalcaligenes* и подвергшихся воздействию NaCl , в значительной степени снижалась. У растений сои, обработанных *P. fluorescens*, в условиях солевого стресса по сравнению с контролем содержание хлорофилла и растворимых в растениях белков было снижено, а содержание пролина увеличено, при этом было зарегистрировано более значительное увеличение длины стебля и веса свежих побегов. То есть инокуляция PGPR уменьшала вредное действие стресса засоления [55]. Показано также, что у растения кукурузы три засухоустойчивых бактериальных штамма *Proteus penneri*, *P. aeruginosa* и *Alcaligenes faecalis* способствовали увеличению относительного содержания воды, белка и сахара за счет повышения содержания пролина [56].

В мини-обзоре Liu и Zhang [57] показано, как летучие органические соединения, продуцируемые PGPR, повышают устойчивость растений к засолению и засухе, а также обеспечению серой и железом. Так, обработка проростков акации *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 летучими органическими соединениями ризобактерии *Robinia pseudoacacia*, в присутствии NaCl показала, что у них, в отличие от необработанных проростков, наблюдалось увеличение свежей массы, количества боковых корней и длины первичного корня. Кроме того, в листьях растения наблюдалось увеличение содержания пролина и активности супeroxиддисмутазы, пероксидазы и глутатионредуктазы. Показано также, что штамм солеустойчивой ризосферной бактерии *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 способствует накоплению в клетках по мере увеличения концентрации NaCl совместимой растворенной трегалозы, что для него является основным механизмом устойчивости к высоким концентрациям соли. Кроме того, штамм JZ-GX1 продуцирует индол-3-уксусную кислоту и сидерофоры растворяет неорганический фосфор при солевом стрессе, а также стимулирует синтез экзополисахаридов, что повышает способность растений противостоять солевому стрессу [58]. Значение экзополисахаридов для защиты растений от колебаний окружающей среды и абиотических стрессов, таких как засуха, засоление или загрязнение тяжелыми металлами, а также их роль во взаимодействиях растений и микробов, подробно рассмотрены в обзоре Morcillo и Manzanares [59].

Возможность использования эндофитных бактерий в качестве альтернативы химическим удобрениям и пестицидам для повышения продуктивности растений и механизмов защиты от биотического и абиотического стрессов подтверждена в работе Shah с соавторами [60]. Из пяти штаммов эндофитных бактерий, выделенных из семян трех разных сортов пакистанской пшеницы, два проявляли солеустойчивость после трех дней инкубации, а один из них проявлял ростостимулирующее действие на инокулированные растения пшеницы.

Оксидательное повреждение белков, липидов и нуклеиновых кислот часто наблюдается при водном стрессе. Некоторые микроорганизмы могут уменьшить эти негативные эффекты за счет производства антиоксидантных молекул или повышения активности антиоксидантных ферментов, таких как каталаза или пероксидаза [61]. Растения базилика, выращенные в условиях водного дефицита, показали повышение активности каталазы при инокуляции *Pseudomonas sp.*, как в монокультуре, так и в составе микробного консорциума из *Pseudomonas sp.*, *Bacillus lenthus* и *Azospirillum brasiliense*. В последнем случае также повышалась активность глутатионпероксидазы и аскорбатпероксидазы [62].

Эта комбинация микробов послужила основой для нескольких успешно коммерциализированных продуктов, таких как BFMS, Environoc, SoilBiotics и HyperGalaxy.

Грибы. Некоторые механизмы защиты растений от недостатка воды связаны с наличием в составе их микробиома грибов. Эндофиты эукариотных растений вообще зачастую относятся к царству грибов [63]. Некоторые штаммы грибов более устойчивые к засухе, чем бактерии, способны обеспечить множество механизмов толерантности, и их численность увеличивается в этих условиях. Грибы могут быть более эффективными по сравнению с бактериями благодаря особенностям роста и свойствам, позволяющим интенсивно осваивать почву, извлекать воду и проникать в ткани растений [64]. Высокие показатели засухоустойчивости обеспечиваются у грибов за счет наличия у них ряда механизмов преодоления стресса засухи, в том числе осмопротекторов, прочных клеточных стенок и синтеза меланина [65]. Нитчатые грибы к тому же производят чрезвычайно длинные гифы, позволяющие извлекать воду из труднодоступных участков почвы, что способствует их активности даже в очень засушливых условиях. Кроме того, гифы грибковых штаммов могут более эффективно, чем корни растений поглощать ионы фосфора и аммония [66]. Грибы могут также влиять на гормональный баланс растений, производя фитогормоны (ауксины, гиббереллины), а также обеспечивать резистентность к биотическим и абиотическим факторам [67]. Известно, что у некоторых растений, обитающих в гиперсоленой прибрежной среде или на геотермальных почвах, выживаемость обеспечивается эндофитными грибами [68].

Инокуляция растений грибами, выделенными из экстремальных сред, представляет собой многообещающую альтернативу для повышения продуктивности в стрессовых условиях, возникающих из-за изменения климатических условий [69]. Так показано, что растения, инфицированные эндофитными грибами, увеличивали высоту, вес, содержание хлорофилла, содержание белка, массу семян и скорость их прорастания в условиях теплового и засушливого стресса [70,71].

Наиболее изученными являются арbusкулярные микоризные грибы (AMF), успешно вступающие в симбиоз со многими растениями, принадлежащими к разным семействам [72]. Исследования показали, что симбиоз с арbusкулярной микоризой (AM) снижает солевой стресс у разных видов растений-хозяев. В рамках симбиотических отношений AMF помогает растениям-хозяевам поглощать азот и фосфор, одновременно получая углерод от хозяев. AMF играет важную роль в сельскохозяйственной экосистеме, обеспечивая стимулирование роста растений, улучшение качества урожая, повышение устойчивости растений к стрессу, стабилизацию структуры почвы, поддержание экологического баланса и устойчивого развития сельского хозяйства [73]. Однако, несмотря на обильную литературу, показывающую смягчение ионного дисбаланса за счет AM-симбиоза, задействованные молекулярные механизмы практически не исследованы.

В экспериментах Qin с соавторами [74] семена арахиса, инокулированные AMF *Rhizophagus correctis* SA и *Funneliformis mosseae* BEG95, показали более высокие скорости нетто-фотосинтеза, относительную влажность листьев, накопление осмолитиков, активность антиоксидантных ферментов, высоту и урожайность растений, как в нормальных условиях, так и в условиях засоления.

Среди грибов в борьбе с повреждающими воздействиями у растений отличаются представители рода *Trichoderma* [22,75,76]. Так, *T. harzianum* - антагонистический микопаразит, колонизирующий корни, как однодольных, так и двудольных растений, стимулирующий увеличение поглощения ими питательных веществ и усиление водоудерживающей способности [77], содействует их лучшему росту и развитию в почвах, подверженных засухе [78]. *Trichoderma* помогает растениям выдерживать стресс от засухи за счет увеличения экспрессии антиоксидантных ферментов, вторичных метаболитов и гормонов [79-80]. Аналогичным образом, колонизация *Theobroma cacao* грибом *Trichoderma hamatum* DIS 219b способствовала увеличению массы корней и содержания в

них влаги. При этом эффект стимуляции проявлялся как в условиях засухи, так и без нее [78].

Другим типом грибов, составляющих часть полезного микробиома растений, являются дрожжи, которые могут быть использованы для контролирования листевых инфекций посредством прямого антагонизма, индукции системной устойчивости или стимуляции развития корней [81]. Silambarasan с соавторами [82] продемонстрировали способность экзополисахаридов, продуцируемых дрожжами, способствовать образованию устойчивых агрегатов, улучшающих сохранение воды в почве. Кроме того, применение дрожжей может активировать ферменты почвы в условиях стресса засухи, что увеличивает в ней содержание питательных веществ, а также улучшает осмотическое состояние корней и активность антиоксидантных ферментов в растениях [83].

Ассоциация AMF с растениями является наиболее распространенной, но точные механизмы из роли в круговороте питательных веществ и их трансформации пока не полностью изучены. Развитие биотехнологических приемов с использованием AMF представляет собой одну из самых экологически чистых альтернатив в контексте устойчивого сельского хозяйства [84,85].

Совместное влияние грибов и бактерий. Арбускулярные микоризные грибы и бактерии могут взаимодействовать синергетически, стимулируя рост растений с помощью ряда механизмов, которые включают улучшение усвоения питательных веществ и ингибирование грибковых патогенов растений. Эти взаимодействия могут иметь решающее значение для разработки устойчивых сельскохозяйственных систем с низким уровнем затрат, которые для поддержания плодородия почвы и здоровья растений полагаются на биологические процессы. В обзоре Miransari [86] представлены данные, касающиеся взаимодействия между грибами арбускулярной микоризы и почвенными бактериями, а также некоторые новые идеи для будущих исследований. Предполагается, что ассоциации культур с AMF, а также азотфиксирующими бактериями, могут служить альтернативной и устойчивой стратегией повышения урожайности на засоленных полях [87]. Показано, что совместная инокуляция AMF с фосфат-солюбилизирующими бактериями способствует росту и повышению урожайности подсолнечника [88]. В работе Bizo [89] рассмотрена роль AMF в сочетании с эндофитными бактериями *P. fluorescens* и *Bacillus sp.*, солюбилизирующими калий и фосфор, а также определены виды грибов *Trichoderma sp.* как наиболее эффективные агенты биоконтроля против болезней оливковых деревьев (например, вертициллезного увядания, корневой гнили и антракноза). Применение AMF совместно с фосфат-солюбилизирующими бактериями при выращивании сливы пляжной в засоленных почвах, смягчило влияние солевого стресса на все параметры роста и усвоение питательных веществ, в особенности роста корней. При этом было предотвращено также значительное снижение скорости фотосинтеза, устьичной проводимости и скорости транспирации [90].

Из-за большой изменчивости среды применение различных микроорганизмов в одном биопрепарate позволяет более эффективно защищать растения. Конечный желаемый эффект зависит от соответствующего уровня взаимодействия микроорганизмов как между собой, так и с растением. Правильное сочетание грибковых и бактериальных штаммов повышает эффективность и надежность, и представляется особенно многообещающим [91]. Для их успешного практического применения необходимо проведение работы по разработке консорциумов и определению их стабильности, а, следовательно, и эффективности в долгосрочной перспективе при использовании в полевых условиях. Предстоит преодолеть множество научных и нормативных препятствий, прежде чем эта технология получит широкое признание и массовое применение [92].

Солеустойчивые PGPB. Из экстремально щелочных, засоленных и натриевых почв были выделены микробы, способные выживать в условиях осмотического и ионного стресса, а многие из них смягчать различные биотические и абиотические стрессы у растений. В последние несколько лет их потенциал в повышении продуктивности

сельскохозяйственных культур, сталкивающихся с солевым стрессом, был исследован на основании четкого предположения о том, что солеустойчивые PGPR можно использовать при мелиорации засоленных агроэкосистем. Их потенциал в повышении продуктивности растений в этих условиях рассматривается в обзоре Egamberdieva с соавторами [93].

У несолеустойчивых PGPR, проявляющих положительное влияние на растения в условиях нормы, с увеличением засоления среды защитные свойства утрачиваются. Солеустойчивые PGPR отличаются наличием многочисленных механизмов, влияющих на физиологические, биохимические и молекулярные реакции растений и помогающие им справиться с солевым стрессом. Эти механизмы включают осмотическое регулирование за счет ионного гомеостаза и накопления осмолитика, защиту от свободных радикалов за счет образования ферментов, улавливающих свободные радикалы, реакции на окислительный стресс и поддержание параметров роста за счет синтеза фитогормонов и других метаболитов. Они способствуют получению питательных веществ, хелатированию металлов, поддержанию водного баланса и ионного гомеостаза, производству фитогормонов, экзополисахаридов, летучих органических соединений и антиоксидантных ферментов, запускающих гены, чувствительные к стрессу, при высоких концентрациях соли [94, 95].

Наиболее эффективными микроорганизмами в повышении устойчивости растений признаны ризобактерии, выделенные из подверженных стрессу мест их обитания [93]. Аналогичным образом конститутивные микробные сообщества агавы [96] и кактусов [97], вероятно, способствуют выживанию этих растений в очень засушливых местах обитания. Исследования Etesami и Beattie [98], а также Hajibadi с соавторами [99] показали, что галофильные PGPR из ризосфера галофитных видов растений могут быть эффективными биоинкулянтами для успешного производства негалофитных видов растений в засоленных почвах. Поскольку солеустойчивые PGPR способствуют лучшей выживаемости растений при засолении, они являются потенциальными кандидатами на повышение продуктивности сельского хозяйства [100].

Заключение

Наиболее эффективной стратегией адаптации растений и повышения их устойчивости к абиотическим стрессам общепризнан экологически чистый способ взаимодействия растений с микробами, позволяющий растениям справляться с неблагоприятными стрессовыми условиями окружающей среды. Микробный консорциум, функционирующий в микробиоме корней, способствует росту растений, повышая регуляцию генов устойчивости к стрессу, а также благодаря регуляции синтеза фитогормонов, осмолитиков, улучшения усвоения питательных веществ и усиления антиоксидантной системы. К настоящему времени у различных бактериальных эндофитов с помощью современных методов исследования выявлено участие более 20 генов эндофитизма, около 50 генов прямого стимулирования роста растений, около 25 генов биологической активности и около 10 генов смягчения различных стрессов [30]. Отбор, скрининг и применение устойчивых к стрессу микроорганизмов могут стать жизнеспособными вариантами, помогающими преодолеть ограничения продуктивности сельскохозяйственных культур в районах, подверженных абиотическим стрессам [101,102].

Однако, несмотря на их высокий потенциал в растениеводстве, их практическое применение затрагивает лишь несколько видов, и большинство ризобактерий не получило широкого распространения. В обзора Chitnis с соавторами [103] и Naing с соавторами [104] подчеркивается важность совместимости активных штаммов эндофитов с конкретными растениями-хозяевами и их микробиомами. Для достижения стабильных результатов будущие исследования должны быть направлены на более детальное исследование микробиомов растений и на отбор полезных микробов в местных полевых условиях [105]. Комплексное понимание взаимодействий растение-PGPR-AMF-почва проложит путь к эффективному использованию микроорганизмов для противодействия стрессам засоления

и засухи [106]. Изучение геномики и комплексного метаболизма эндофитов и растений позволит полнее использовать результаты их продуктивной ассоциации [107].

Финансирование

Работа выполнена при поддержке КН МОН РК (грант № АР09258751).

Литература:

- 1 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; 11, 163. (doi:10.1186/1471-2229-11-163)
- 2 Khan N., Bano A., Rahman M. A., Guo J., Kang Z., Babar M. A. Comparative Physiological and Metabolic Analysis Reveals a Complex Mechanism Involved in Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Induced by PGPR and PGRs *Scientific Reports* 2019, vol. 9, Article number: 2097
- 3 Ha-Tran D.M., Nguyen T. T. M., Hung S.-H., Huang E., Huang C.-C. Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Stimulating Salinity Stress Defense in Plants: A Review *Int J Mol Sci.* 2021; 22(6):3154. (doi:10.3390/ijms22063154)
- 4 Gul Z., Tang Z.-H., Arif M., Ye Z. An Insight into Abiotic Stress and Influx Tolerance Mechanisms in Plants to Cope in Saline Environments *Biology (Basel)*.2022; 11(4):597. (doi: 10.3390/biology11040597.)
- 5 Jiménez-Mejía, R.; Medina-Estrada, R.I.; Carballar-Hernández, S.; Orozco-Mosqueda, M.d.C.; Santoyo, G.; Loeza-Lara, P.D. Teamwork to Survive in Hostile Soils: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Ameliorate Soil Salinity Stress in Crops. *Microorganisms* 2022, 10, 150. (doi: 10.3390/microorganisms10010150)
- 6 Gupta A., Mishra R., Rai S., Bano A., Pathak N., Fujita M., Kumar M., Hasanuzzaman M. Mechanistic Insights of Plant Growth Promoting Bacteria Mediated Drought and Salt Stress Tolerance in Plants for Sustainable Agriculture *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3741. (doi:10.3390/ijms23073741)
- 7 Mashabela M. D., Piater L. A., Dubery I. A., Tugizimana F., Mhlongo M. I. Rhizosphere Tripartite Interactions and PGPR-Mediated Metabolic Reprogramming towards ISR and Plant Priming: A *Metabolomics Review Biology* 2022, 11(3), 346. (doi.org/10.3390/biology11030346)
- 8 Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies Front. *Plant Sci.*, 2017 Sec. *Functional Plant Ecology*. (doi.org/10.3389/fpls.2017.00172)
- 9 Judith Naamala , Donald L Smith, Microbial Derived Compounds Are a Promising Approach to Mitigating Salinity Stress in Agricultural Crops Front *Microbiol.* 2021 Nov 19;12:765320. (doi: 10.3389/fmicb.2021.765320)
- 10 AFSHAN R., Korejo F, Sultana V, Ara J, Ehteshamulhaque SYED. Induction of systemic resistance in cotton by the plant growth promoting rhizobacterium and seaweed against charcoal rot disease. *Pak. J. Bot.* 2017; 49:347–353.
- 11 Moustakas M., Sperdouli I., Kouna T., Antonopoulou C. I., Therios I. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regul.* 2011. 65 315–325. (doi: 10.1007/s10725-011-9604-z)
- 12 Labudda M. Lipid Peroxidation as a Biochemical Marker for Oxidative Stress During Drought. *An Effective Tool for Plant Breeding*. 2013. Poland: E-wydawnictwo. (doi:10.1007/s10725-011-9604-z)
- 13 Natarajan S. K., Zhu W., Liang X., Zhang L. . Demers A. J., Zimmerman M. C, Simpson M. A., Becker D. F Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death Free Radic Biol Med. 2012; 53(5):1181-91. (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.002)
- 14 Zhang Y., Rui C., Fan Y., Xu N., Zhang H., Wang J., Sun L., Dai M., Ni K., Chen X., Lu X., Wang D., Wang J., Wang S., Guo L., Zhao L., Feng X., Chen C., Ye W. Identification of SNAT Family Genes Suggests GhSNAT3D Functional Reponse to Melatonin Synthesis Under Salinity Stress in Cotton Front *Mol Biosci.* 2022; 9:843814. (doi:10.3389/fmolb.2022.843814)
- 15 Wani S. H., Kumar V., Shriram V., Sah S. K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 2016. 4 162–176. (doi: 0.1016/j.cj.2016.01.010)
- 16 Nguyen, V. T.; Nguyen, T. K. D., 2016. A response of feed intake, carcass value and economic return of crossbred rabbits (New Zealand x local) to the mixed or separate feedings. Proc. *11th World Rabbit Congress*, June 15-18 2016, Qingdao, China: 455-458
- 17 Verma S.K., Sahu P.K., Kumar K., Pal G., Gond S.K., Kharwar R.N.,White J.F. Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance *Journal of Applied Microbiology* 2021 Vol. 131, Issue 5 p. 2161-2177 (doi: 10.1111/jam.15111)

- 18 Burragoni S. G., Jeon J. Applications of endophytic microbes in agriculture, biotechnology, medicine, and beyond *Microbiological Research* 2021, Vol. 245, 126691 (doi:10.1016/j.micres.2020.126691)
- 19 Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 2012. 17 478–486. (doi :10.1016/j.tplants.2012.04.001)
- 20 White, J. F., Kingsley, K. I., Kowalski, K. P., Irizarry, I., Micci, A., Soares, M. A. Disease protection and allelopathic interactions of seed transmitted endophytic Pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). *Plant. Soil.* 2017. 422, 195–208. (doi: 10.1007/s11104-016-3169-6)
- 21 Vardharajula S., Ali S. Z., Grover M., Reddy G., Bandi V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress *Journal of Plant Interactions* 2011, Vol. 6, - Issue 1 P. 1-14 (doi:10.1080/17429145.2010.535178)
- 22 Jay A.K., Verma P. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review: *Microbiological Research* 2018, Vol. 207, P. 41-52 (doi:10.1016/j.micres.2017.11.004)
- 23 Gamalero, E.; Glick, B.R. Recent Advances in Bacterial Amelioration of Plant Drought and Salt Stress. *Biology* 2022, 11, 437. (doi:10.3390/biology11030437)
- 24 Bilal, S., Khan, A. L., Shahzad, R., Asaf, S., Kang, S. M., and Lee, I. J. Endophytic Paecilomyces formosus LHL10 augments Glycinemax L. adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. *Front. Plant Sci.* 2017. 8:870. (doi: 10.3389/fpls.2017.00870)
- 25 Kearn J., McNary C., Lowman J S., Mei C., Aanderud Z. T., Smith S. T., West J., Colton E., Hamson M., Nielsen B. L Salt-Tolerant Halophyte Rhizosphere Bacteria Stimulate Growth of Alfalfa in Salty Soil *Front Microbiol.* 2019; 10:1849. (doi: 10.3389/fmicb.2019.01849)
- 26 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. 119, 211–223. (doi: 10.1016/j.plaphy.2017.08.029)
- 27 Zou, P., Lu, X., Jing, C., Yuan, Y., Lu, Y., Zhang, C., et al. Low-molecular-weight polysaccharides from *pyropia yezoensis* enhance tolerance of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) to salt stress. *Front. Plant Sci.* 2018. 9, 427. (doi: 10.3389/fpls.2018.00427)
- 28 Bhattacharyya, P. N., Jha, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. 28 (4), 1327–1350. (doi: 10.1007/s11274-011-0979-9)
- 29 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. J.* 2012. 31 (2), 152–164. (doi: 10.5423/PPJ.OA.12.2014.0136)
- 30 Dudeja S. S., Suneja-Madan P., Pau M., Maheswari R., Kothe E. Bacterial endophytes: Molecular interactions with their hosts *J Basic Microbiol.* 2021; 61(6):475-505. (doi: 10.1002/jobm.202000657.)
- 31 Morales-Cedeño L. R., Orozco-Mosqueda M. D. C., Loeza-Lara P. D., Parra-Cota F. I., de Los Santos-Villalobos S., Santoyo G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives *Microbiol Res.* 2021; 242:126612. (doi: 10.1016/j.micres.2020.126612.)
- 32 Adedayo, A.A.; Babalola, O.O.; Prigent-Combaret, C.; Cruz, C.; Stefan, M.; Kutu, F.; Glick, B.R. The Application of Plant GrowthPromoting Rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* Production in the Agricultural System: A Review. *PeerJ* 2022, 10, e13405.
- 33 Yadav, A.N.; Kumar, V.; Dhaliwal, H.S.; Prasad, R.; Saxena, A.K. Microbiome in Crops: Diversity, Distribution, and Poten-tial Role in Crop Improvement. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 305–332.
- 34 Kour, D.; Rana, K.L.; Kaur, T.; Sheikh, I.; Yadav, A.N.; Kumar, V.; Dhaliwal, H.S.; Saxena, A.K. Microbe-Mediated Allevia-tion of Drought Stress and Acquisition of Phosphorus in Great Millet (*Sorghum bicolor* L.) by Drought-Adaptive and Phos-phorusSolubilizing Microbes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020, 23, 101501.
- 35 Liszka M. J., Clark M. E., Schneider E., Clark D. S. Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2012 Vol. 3:77-102. (doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114239)
- 36 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. 44 (2), 165–174. (doi: 10.1023/B:GROW.0000049414.03099.9b)

- 37 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; 6, 34768. (doi: 10.1038/srep34768)
- 38 Orozco-Mosqueda M. D. C., Glick B. R, Santoyo G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops *Microbiol Res.* 2020; 235:126439. (doi: 10.1016/j.micres.2020.126439)
- 39 Radhakrishnan R., Hashem A., Abd Allah E. F Bacillus: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments *Review Front Physiol.* 2017; 8:667. (doi: 10.3389/fphys.2017.00667)
- 40 Fonseca-García C., Coleman-Derr D., Garrido E., Visel A., Tringe S. G., Partida-Martínez L. P. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity . *Front Microbiol.* 2016; 7: 150.(doi: 10.3389/fmicb.2016.00150)
- 41 Lopes R., Tsui S., Gonçalves P. J R O, de Queiroz M. V. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants *World J Microbiol Biotechnol.* 2018; 34(7):94. (doi: 10.1007/s11274-018-2479-7.)
- 42 Aloo B N, Makumba B A, Mbega E R The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability *Microbiol Res.* 2019; 219:26-39. (doi: 10.1016/j.micres.2018.10.011.)
- 43 El-Esawi M. A, Alaraidh I. A, Alsahl A. A, Alamri S. A, Ali H. M, Alayafi A. A *Bacillus firmus* (SW5) augments salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating root system architecture, antioxidant defense systems and stress-responsive genes expression *Plant Physiol Biochem.* 2018; 132:375-384. (doi: 10.1016/j.plaphy.2018.09.026.)
- 44 Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd Allah, E.F. Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Front. Physiol.* 2017, 8, 667. (doi.org/10.3389/fphys.2017.00667)
- 45 Kazerooni E. A., Maharachchikumbura S. S. N., Adhikari A., Al-Sadi A. M., Kang S.-M., Kim L.-R., Lee I.-J. Rhizospheric *Bacillus amyloliquefaciens* Protects *Capsicum annuum* cv. Geumsugangsan From Multiple Abiotic Stresses via Multifarious Plant Growth-Promoting Attributes *Front. Plant Sci.*, 2021, (doi.org/10.3389/fpls.2021.669693)
- 46 Nan J., Zhang S., Jiang L. Antibacterial Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* GJ1 against Citrus Huanglongbing Plants (Basel). 2021; 10(2):261. (doi: 10.3390/plants10020261)
- 47 Lim, J.H.; Kim, S.D. Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *Plant Pathol. J.* 2013, 29, 201–208. (doi: 10.5423/PPJ.SI.02.2013.0021)
- 48 Bokhari A., Essack M., Lafi F. F., Andres-Barrao C., Jalal R., Alamoudi S., Razali R., Alzubaidy H., Shah K. H., Siddique S., Bajic V. B., Hirt H., Saad M. M. Author Correction: Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance *Sci Rep.* 2020; 10: 3001. (doi: 10.1038/s41598-020-58957-w)
- 49 Soni R., Keharia H. Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming *Bacilli* *Planta*. 2021; 254(3):49. (doi: 10.1007/s00425-021-03695-0.)
- 50 Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Boyce A. N. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review *Molecules* 2016, 21, 573; (doi:10.3390/molecules21050573)
- 51 Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kim, M. J., Park, J. M., Kim, B. R., et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 2014, 84, 115–124. (doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.001)
- 52 Neshat M., Abbasi A., Hosseinzadeh A., Sarikhani M.R., Dadashi Chavan D., Rasoulnia A. Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. *Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology*, 2022, 28(2):347-361 (doi: 10.1007/s12298-022-01128-0)
- 53 Naveed M., Mitter B., Reichenauer T. G., Wieczorek K., Sessitsch A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17 *Environmental and Experimental Botany* 2014, Vol. 97, P. 30-39 (doi:10.1016/j.envexpbot.2013.09.014)
- 54 Yasmin H., Naeem S., Bakhtawar M., Jabeen Z., Nosheen A., Naz R., Keyani R., Mumtaz S., Hassan M. N. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas* *pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate

systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress *PLoS One.* 2020; 15(4):e0231348. (doi: 10.1371/journal.pone.0231348.)

55 Abulfaraj A. A., Jalal R. S. Use of plant growth-promoting bacteria to enhance salinity stress in soybean *Glycine max* L. plants *Saudi J Biol Sci.* 2021; 28(7):3823-3834. (doi: 10.1016/j.sjbs.2021.03.053.)

56 Naseem H., Bano A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize, 2014 (doi:10.1080/17429145.2014.902125)

57 Liu X.-M., Zhang H. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance *Front Plant Sci.* 2015; 6:774. (doi: 10.3389/fpls.2015.00774.)

58 Li P.-S., Kong W.-L., Wu X.-Q., Zhang Y. Volatile Organic Compounds of the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria JZ-GX1 Enhanced the Tolerance of *Robinia pseudoacacia* to Salt Stress *Front Plant Sci.* 2021; 12:753332. (doi: 10.3389/fpls.2021.753332.)

59 Morcillo R. J L, Manzanera M. The Effects of Plant-Associated Bacterial Exopolysaccharides on Plant Abiotic Stress Tolerance Metabolites. 2021; 11(6):337. (doi: 10.3390/metabo11060337)

60 Shah D., Khan M. S., Aziz S., Ali H., Pecoraro L. Molecular and Biochemical Characterization, Antimicrobial Activity, Stress Tolerance, and Plant Growth-Promoting Effect of Endophytic Bacteria Isolated from Wheat Varieties. *Microorganisms* 2022, 10(1), 21; (doi:10.3390/microorganisms10010021)

61 Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 2016, 184, 13–24. (doi: 10.1016/j.micres.2015.12.003)

62 Heidari, M., Golpayegani, A. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Saudi Soc. Agr. Sci.* 2012, 11, 57–61. (doi:10.1016/j.jssas.2011.09.001)

63 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, 9, 1729. (doi:10.3390/microorganisms9081729)

64 Hanaka, A.; Ozimek, E.; Reszczyńska, E.; Jaroszuk-Sciseł, J.; Stolarz, M. Plant Tolerance to Drought Stress in the Presence of Supporting Bacteria and Fungi: An Efficient Strategy in Horticulture. *Horticulturae* 2021, 7, 390. (doi:10.3390/horticulturae7100390)

65 Jiménez-Arias, D.; García-Machado, F.J.; Morales-Sierra, S.; García-García, A.L.; Herrera, A.J.; Valdés, F.; Luis, J.C.; Borges, A.A. A beginner's guide to osmoprotection by biostimulants. *Plants* 2021, 10, 363. (doi:10.3390/plants10020363)

66 Matias, S.R.; Pagano, M.C.; Muzzi, F.C.; Oliveira, C.A.; Carneiro, A.A.; Horta, S.N.; Scotti, M.R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *Eur. J. Soil Biol.* 2009, 45, 259–266. (doi:10.1016/j.ecolind.2010.09.001)

67 Dreischhoff, S., Das, I.S., Jakobi, M., Kasper, K., Polle, A. Local responses and systemic induced resistance mediated by ectomycorrhizal fungi. *Front. Plant Sci.* 2020, 11, 590063 (doi:10.3389/fpls.2020.590063)

68 Rodriguez R. J., White J. F. Jr, Arnold, A. E. Redman R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles *New Physiologist* 2009, Vol.182, Issue2 P. 314-330 (doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x)

69 Acuña-Rodríguez, I.S., Ballesteros, G.I., Atala, C., Gundel, P.E., Molina-Montenegro, M.A. Hardening Blueberry Plants to Face Drought and Cold Events by the Application of Fungal Endophytes. *Agronomy* 2022, 12, 1000. (doi:10.3390/agronomy12051000)

70 Bilal, S., Khan, A. L., Shahzad, R., Asaf, S., Kang, S. M., and Lee, I. J. Endophytic Paecilomyces formosus LHL10 augments *Glycinemax* L. adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. *Front. Plant Sci.* 2017. 8:870. (doi: 10.3389/fpls.2017.00870)

71 Khan, A. L., Shin, J. H., Jung, H. Y., Lee, I. J. Regulations of capsaicin synthesis in *Capsicum annuum* L. by *Penicillium resedanum* LK6 during drought conditions. *Sci. Horti.* 2014. 175, 167–173. (doi: 10.1016/j.scientia.2014.06.008)

72 Adamec, S.; Andrejiová, A. Mycorrhiza and stress tolerance of vegetables: A review. *Acta Hortic. Regiotect.* 2018, 21, 30–35. (doi: 10.2478/ahr-2018-0008)

73 Yang W.-Y., Sun L.-Y., Song F.-B., Yang X.-Q., Zhang M.-J., Li S.-X., Zhu X.-C. [Research advances in species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in terrestrial agro-ecosystem] *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 2019; 30(11):3971-3979. (doi: 10.13287/j.1001-9332.201911.036.)

74 Qin W., Yan H., Zou B., Guo R., Ci D., Tang Zh., Zou X., Zhang X., Yu X., Wang Y., Si T., Qin W., Yan H., Zou B., Guo R., Ci D., Tang Z., Zou X., Zhang X., Yu X., Wang Y., Si T. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate salinity stress in peanut: Evidence from pot-grown and field experiments. *Food and Energy Security* 2021 Vol,10, Issue4 e314 (doi:10.1002/fes.3.314)

75 Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., et al. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus. *Microb. Pathog.* 129, 7–18. (doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.042)

76 Szczalba, M., Kopta, T., Gąstoł, M., and Sēkara, A. (2019). Comprehensive insight into arbuscular mycorrhizal fungi, Trichoderma spp. and plant multilevel interactions with emphasis on biostimulation of horticultural crops. *J. Appl. Microbiol.* 127, 630–647. (doi: 10.1111/jam.14247)

77 Doni F., Isahak A., Radziah C., Zain C. M., Mohtar W., Yusoff W. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to Trichoderma spp. *Inoculants Research article AMB Express* 2014, 4, 45. (doi: 10.1186/s13568-014-0045-8)

78 Bae H., Sicher R. C., Kim M. S, Kim S.-H., Strem M. D, Melnick R. L, Bailey B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao* *J Exp Bot.* 2009; 60(11):3279-95. (doi: 10.1093/jxb/erp165.)

79 Pandey V., Ansari M.W., Tula S., Yadav S., Sahoo R.K., Shukla N., Bains G., S. Badal, Chandra S., Gaur A.K. , Kumar A., Shukla A., Kumar J., Tuteja N. Dose-dependent response of *Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes *Planta*, 2016, 243, 1251-1264. (doi: 10.1007/s00425-016-2482-x.)

80 Alwhibi1 M. S., Hashem A., Abd_Allah E. F., Alqarawi A. A., Soliman D. W. K., Wirth S., Egamberdieva D. Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture* 2017, 16(8): 1751–1757.

81 Fadiji A. E., Babalola O. O., Santoyo G., Perazzoli M. The Potential Role of Microbial Biostimulants in the Amelioration of Climate Change-Associated Abiotic Stresses on Crops Front. *Microbiol.*, 14 January 2022 Sec. Microbial Symbioses. (doi:10.3389/fmicb.2021.829099)

82 Silambarasan, S.; Logeswari, P.; Cornejo, P.; Kannan, V.R. Evaluation of the Production of Exopolysaccharide by Plant Growth Promoting Yeast *Rhodotorula* sp. Strain CAH2 under Abiotic Stress Conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 121, 55–62. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016)

83 Alzandi, A.A.; Naguib, D.M. Effect of Yeast Application on Soil Health and Root Metabolic Status of Corn Seedlings under Drought Stress. *Arch. Microbiol.* 2022. (doi: 10.1007/s00203-022-02843-8)

84 Borie, F.; Aguilera, P.; Castillo, C.; Valentine, A.; Seguel, A.; Barea, J.M.; Cornejo, P. Revisiting the Nature of Phosphorus Pools in Chilean Volcanic Soils as a Basis for Arbuscular Mycorrhizal Management in Plant P Acquisition. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2019, 19, 390–401. (doi: 10.1007/s42729-019-00041-y)

85 Seguel, A.; Meier, F.; Azcón, R.; Valentine, A.; Meriño-Gergichevich, C.; Cornejo, P.; Aguilera, P.; Borie, F. Showing Their Mettle: Extraradical Mycelia of Arbuscular Mycorrhizae Form a Metal Filter to Improve Host Al Tolerance and P Nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 2020, 100, 803–810. (doi:10.1002/jsfa.10088)

86 Miransari M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 89(4):917-30. (doi: 10.1007/s00253-010-3004-6.)

87 Hanin M., Ebel C., Ngom M., Laurent L., Masmoudi K. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7, 1787 (doi:10.3389/fpls.2016.01787)

88 Nacoon S., Jogloy S., Riddech N., Mongkolthanaruk W., Ekprasert J., Cooper J., Boonlue S. Combination of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria on growth and production of *Helianthus tuberosus* under field condition *Sci Rep.* 2021, 11(1):6501. (doi: 10.1038/s41598-021-86042-3.)

89 Bizos, G., Papatheodorou, E.M., Chatzistathis, T., Ntalli, N., Aschonitis, V.G., Monokrousos, N. The role of microbial inoculants on plant protection, growth stimulation, and crop productivity of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plants* 2020, 9, 743. (doi:10.3390/plants9060743)

90 Zai X.-M., Fan J.-J., Hao Z.-P., Liu X.-M., Zhang W.-X. Effect of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing fungi on nutrient uptake and photosynthesis of beach palm under salt stress environment *Sci Rep.* 2021, 11(1):5761. (doi:10.1038/s41598-021-84284-9.)

91 Hanaka, A., Ozimek, E., Reszczyńska, E., Jaroszuk-Scisieł, J., Stolarz, M. Plant Tolerance to Drought Stress in the Presence of Supporting Bacteria and Fungi: An Efficient Strategy in Horticulture. *Horticulturae* 2021, 7, 390. (doi:10.3390/horticulturae7100390)

92 Gamalero, E.; Glick, B.R. Recent Advances in Bacterial Amelioration of Plant Drought and Salt Stress. *Biology* 2022, 11, 437. (doi:10.3390/biology11030437)

93 Egamberdieva D., Wirth S., Bellingrath-Kimura S. D., Mishra J., Arora N. K. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils 2019/12/18 *Frontiers in microbiology* 10: 2791 (doi:10.3389/fmicb.2019.02791)

94 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.*, 07 July 2020 Sec. *Microbiotechnology* (doi:10.3389/fmicb.2020.01216)

95 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 | (doi:10.3389/fmicb.2021.660075)

96 Coleman-Derr D., Desgarennes D., Fonseca-Garcia C., Gross S., Clingenpeel S., Woyke T., North G., Visel A., Partida-Martinez L. P., Tringe S. G. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species *New Phytol.* 2016; 209(2):798-811. (doi: 10.1111/nph.13697)

97 Fonseca-García C., Coleman-Derr D., Garrido E., Visel A., Tringe S. G., Partida-Martínez L. P. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity Front *Microbiol.* 2016; 7: 150. (doi: 10.3389/fmicb.2016.00150) PMCID: PMC4751269 PMID: 26904020

98 Etesami H., Beattie G. A. Mining Halophytes for Plant Growth-Promoting Halotolerant Bacteria to Enhance the Salinity Tolerance of Non-halophytic Crops Front *Microbiol.* 2018; 9: 148. (doi: 10.3389/fmicb.2018.00148)

99 Hajiabadi A. A., Arani A. M., Ghasemi S., Rad M. H., Etesami H., Manshadi S. S., Dolati A. Mining the rhizosphere of halophytic rangeland plants for halotolerant bacteria to improve growth and yield of salinity-stressed wheat *Plant Physiol Biochem.* 2021; 163:139-153. (doi: 10.1016/j.plaphy.2021.03.059.)

100 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; 252:126861. (doi: 10.1016/j.micres.2021.126861)

101 Morales-Cedeño L. R., Orozco-Mosqueda M. D. C., Loeza-Lara P. D., Parra-Cota F. I., de Los Santos-Villalobos S., Santoyo G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives *Microbiol Res.* 2021; 242:126612. (doi: 10.1016/j.micres.2020.126612.)

102 Rana K. L., Kour D., Kaur T., Devi R., Yadav A. N., Yadav N., Dhaliwal H. S., Saxena A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability *Antonie Van Leeuwenhoek* 2020; 113(8):1075-1107. (doi: 10.1007/s10482-020-01429-y.)

103 Chitnis V.R., Suryanarayanan T.S., Nataraja K.N., Prasad S. R., Oelmüller R., Shaanker R. U. Fungal Endophyte-Mediated Crop Improvement: The Way Ahead *Front. Plant Sci.*, 2020 | (doi:10.3389/fpls.2020.561007)

104 Naing A. H., Maung T.-T., Kim C. K. The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress *Physiol Plant.* 2021; 173(4):1992-2012. (doi: 10.1111/ppl.13545.)

105 Sangiorgio D., Cellini A., Donati I., Pastore C., Onofrietti C. , Spinelli F. Facing Climate Change: Application of Microbial Biostimulants to Mitigate Stress in Horticultural Crops *Agronomy* 2020, 10, 794. (doi:10.3390/agronomy10060794)

106 Sagar, A.; Rathore, P.; Ramteke, P.W.; Ramakrishna, W.; Reddy, M.S.; Pecoraro, L. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Synergistic Interactions to Counteract the Negative Effects of Saline Soil on Agriculture: Key Macromolecules and Mechanisms. *Microorganisms* 2021, 9, 1491. (doi:10.3390/ microorganisms9071491)

107 Khare E., Mishra J., Arora N. K. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front. Microbiol.*,2018 (doi:10.3389/fmicb.2018.02732)

М.Г. САУБЕНОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА¹, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1*}, Г.Ж. АБДИЕВА²,
М.Е. ЕЛУБАЕВА¹

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

²әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: zhan98_14@mail.ru

ТҮЗДҮ СТРЕСС ЖАҒДАЙЫНДА ӨСІМДІКТЕРДІҢ ТӨЗІМДІЛІГІН АРТТАРУДАҒЫ ЭНДОФИТТІ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ РӨЛІ

Түйін

Тұздану, соның ішінде құргақшылыққа байланысты, өсімдіктердің өнімділігін 60% - ға дейін жоғалтады. Абиотикалық стресстермен құресте өсімдіктерде колонизациялайтын және олардың әртүрлі зақымдайтын әсерлерге қарсы тұру қабілетін арттыратын эндофиттерді қолдану маңызды бола түсude. Өсімдіктердің өсуіне ықпал ететін микроорганизмдер өсімдіктердегі метаболикалық бұзылуларды қалпына келтіреді, олардың өсуін ынталандырады, стресстік әсерлерден қоргайды, физиологиялық процестерді қалпына келтіреді және сақтайды. Стресске төзімді микроорганизмдерді тандау, скрининг және қолдану абиотикалық стресске ұшыраған аймақтардағы дақылдардың өнімділік шектеулерін женуге көмектесетін ең жақсы нұсқа болып табылады. Шолуда микробтардың өзара әрекеттесу механизмдерін және әртүрлі метаболиттердің, акуыздардың, ферменттердің жинақталуы мен қүшесінің биохимиялық жолдарын түсінуге ықпал ететін әртүрлі омдық тәсілдерді пайдалана отырып, молекулалық, биохимиялық, физиологиялық және ультракүрьымдық параметрлерді ескере отырып, әртүрлі гендердің реттелуін арттыру және азайту, микробтар арқылы стрессті азайту стратегиясына қатысты ғылыми дәлелдер келтірілген. Бактериялардың, санырауқұлақтардың және олардың комбинацияларының өсімдіктерді қоректік заттармен қамтамасыз етудегі, иесі өсімдікті қоршаган органдың күйзелісінен қорғаудағы рөлі көрсетілген.

Кілтті сөздер: эндофиттер, абиотикалық стресс, тұзға төзімділік.

IRSTI: 34.27.51, 34.27.23, 68.03.07

M.G. SAUBENOVA¹, Ye.A. OLEINIKOVA¹, Zh.N. YERMEKBAY^{1*}, G. Zh. ABDIEVA²,
M.Y. YELUBAEVA¹

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

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: zhan98_14@mail.ru

THE ROLE OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS IN INCREASING PLANT RESISTANCE UNDER SALT STRESS

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.01

Abstract

Salinization, including those associated with drought, causes a loss of plant yield of up to 60%. In the fight against abiotic stress, the use of endophytes that colonize plants and increase their ability to withstand various damaging effects is becoming increasingly important. Microorganisms that promote plant growth restore metabolic disorders in plants, stimulating their growth, protecting them from stress, restoring and preserving physiological processes. It is emphasized that the selection, screening and use of stress-resistant microorganisms is the best option to help overcome the limitations of crop productivity in areas subject to abiotic stress. The review provides scientific data on the microbe-mediated stress mitigation strategy, taking into account molecular, biochemical, physiological and ultrastructural parameters using various omic approaches that contribute to understanding the mechanisms of microbial interactions and biochemical ways of accumulation and enhancement of various metabolites, proteins, enzymes, as well as increasing and decreasing the regulation of various genes. The role of bacteria, fungi and their

combinations in providing plants with nutrients, in protecting the host plant from environmental stresses is shown.

Keywords: endophytes, abiotic stress, salt tolerance.

About 96.5% of agricultural lands in the world are subject to abiotic stresses [1]. The most serious of them is associated with drought and salinization, since it affects biodiversity and soil composition, worsens the condition of plants, affects their productivity, causing crop losses of up to 60% [1-4].

In the fight against the damaging effects of abiotic factors, along with traditional methods of using more resistant varieties of cultivated plants, the use of endophytic microorganisms that increase the ability of plants to withstand various damaging effects is becoming increasingly important [5,6]. Microorganisms that promote plant growth (PGPR) restore metabolic disorders in plants, stimulating their growth, protecting them from stress, restoring and preserving physiological processes. Currently, there is no doubt that the use of microorganisms is a serious alternative to traditional farming methods as a means of ensuring sustainable plant growth, increasing yields and plant protection, and, consequently, sustainable food production and maintaining food security. However, in the field, the success of their application remains low, so it is necessary to deepen research in the field of creating suitable and viable PGPR formulations for large-scale agricultural applications.

Recent developments in the field of metabolomics have made it possible to conduct a detailed and comprehensive analysis of the metabolome and metabolic disorders in plants due to environmental changes and, first of all, three-way interactions between plants, PGPR and pathogens [7]. It is also suggested that due to restrictions on the maintenance of the vital activity of microorganisms in various stressful conditions, it is advisable to use their metabolites that contribute to stress mitigation regardless of environmental situations [8]. Such a technological approach is currently gaining popularity among researchers seeking to complement and solve key problems associated with the use of microorganisms to accelerate plant growth. Its advantage is the lower susceptibility of chemical compounds to salt stress, small doses of application and ease of storage, in comparison with living microorganisms [9]. However, this approach does not take into account the possibility of reproduction of microbial cells *in vivo* and reducing the need for repeated exposure. Nevertheless, both approaches may be promising depending on the circumstances.

Plant response to salinization stress.

Unfavorable environmental conditions force plants to develop specific adaptive reactions that promote adaptation (acclimatization) to them, including the development of morphological and physiological signs that help growth in changed conditions. The usual reaction of halophytes to soil salinization is the compartmentalization of toxic ions in vacuoles and the accumulation of compatible solutes in the cytoplasm for osmoprotection, such as sugars and polyols, as well as proline or glycine betaine, which directly stabilize proteins and membrane structures under dehydration and protect cells from oxidative stress. At the same time, amino acids and organic acids contribute to maintaining the gradient of water potential from soil to plants, while sugars are involved in regulating osmotic pressure [10].

In ensuring cellular homeostasis, special attention is paid to the role of proline used to compensate for cellular imbalance caused by environmental stress. The widespread use of proline in nature as a stress adapter molecule indicates that it plays a fundamental biological role in the stress response. Proline and soluble sugars are osmotic molecules that accumulate in response to various environmental stress factors, including drought [11], and reduce the damage caused by oxidative stress [12]. Proline can act as a signaling molecule modulating mitochondrial functions, affecting cell proliferation or death and causing the expression of a specific gene, which may be important for plant recovery after stress [13].

In recent years, special attention has been paid to melatonin [14] associated with abiotic stresses, such as drought, radiation, extreme temperatures and chemical stresses. Exogenously applied melatonin can also improve the ability of plants to tolerate abiotic stresses.

It has been shown that phenotypic changes that allow plants to withstand stressful situations can be positively modulated by symbiotic microorganisms [15].

Microorganisms that promote plant growth (PGPR).

The metabolic and genetic capabilities of microorganisms make them suitable weapons to combat extreme environmental conditions. Their interaction with plants causes various kinds of local and systemic reactions that increase the ability of plants to fight abiotic stresses [16]. Evidence of the important properties of microbial interactions with plants is a significant amount of accumulating data that suggest the presence of deep mechanisms based on interactions between plants and microbes, modulation of cellular, biochemical and molecular mechanisms associated with resistance to stress.

Numerous studies have established that the obligatory presence of microorganisms-endophytes of non-pathogenic nature in all plants without exception, their ability to improve plant access to soil nutrients and increase resistance to stresses of various nature, provides the possibility of both the very existence of plants and increasing their yield [17,18]. It has been shown that even when grown in the same soil, different plant species contain different microbiological communities [19].

Regardless of the water content, PGPB provide plants with nutrients and improve environmental conditions for their continuous growth. PGPB play a vital role by increasing the content of nitrogen, phosphorus, iron, etc., protect the host plant from environmental stresses and help mitigate the antagonistic effects of stress [20]. PGPR have the ability to synthesize hormones that stimulate the growth and development of plants under stress. They reduce antioxidant activity, as well as increase the production of proline, free amino acids and sugar in plants [21]. In addition, PGPB also uses such mechanisms of influence on physiological, biochemical and molecular reactions that help plants cope with salt stress as synthesis of exopolysaccharides that protect plant cells from water loss and stabilize soil aggregates [22]; synthesis of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and peroxidase) that prevent the harmful effects of reactive oxygen species; synthesis of antibiotics that protect plants weakened by stress from soil pathogens; synthesis of an enzyme that reduces the level of ethylene in plants, which reduces stress-induced aging of plants, reduced absorption of excess nutrients / heavy metals; induction of resistance genes to abiotic stress. At the same time, the most successful PGPB have several of these mechanisms [23].

It has been shown that stimulating the growth of plants, including those sensitive to salt, can be provided by salt-resistant (halophilic) rhizobacteria isolated from saline soils [24,25].

Bacteria. Numerous studies have established that the tolerance of various plant cultures to salt stress can be increased with the help of exogenous biostimulants such as rhizobacteria [26,27], which contribute to improving seed germination, while increasing biomass and plant productivity [28,29]. In addition, PGPR can be used in seed biolading techniques, since this approach demonstrates promising opportunities for increasing their viability, rapid germination and uniformity of seedling growth [30].

A systematic and in-depth review of the current state of endophytic bacterial diversity, their colonization strategies and their beneficial effects on sustainable agriculture by reducing and/or eliminating the use of toxic agrochemicals, as well as protective agents against plant diseases and to increase crop yields, is presented in the review by Morales-Cedeño and co-authors [31]. It has been shown that bacteria with PGP attributes are key components of the soil capable of establishing useful associations with plants [32]. Their most studied representatives are described in the works of Yadav with co-authors [33] and Kour with co-authors [34].

The composition of microorganisms that promote plant growth includes various genera *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia* and *Azotobacter* [22]. The genus *Bacillus* stands out among *Firmicutes*, which is an

important resource for studying halophilic enzymes and metabolic pathways for remediation of pollutants in saline soil [35]. The most common and studied endophytic bacteria belong to *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Burkholderia*, *Rhizobium* and *Klebsiella* are dominant among them in most legumes and non-leguminous plants. Most PGPR include various strains of *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhizobium* species [36,37].

Among the most studied in this regard, rhizobacteria are bacilli capable of producing a number of biologically active substances that have beneficial effects on plants, whose ability to form spores helps survival in adverse conditions. With a lack of water in the soil, an increase in its salinity, as well as the accumulation of heavy metal salts, the metabolites of these organisms (including exopolysaccharides and siderophores) prevent the movement of toxic ions, regulate the ion balance and transport of water in plant tissues, while simultaneously controlling the populations of pathogens. The indole-3-acetic acid, gibberellic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase synthesized by them regulate intracellular metabolism of phytohormones and increase plant resistance to stress. Bacilli producing deaminase have advantages as bioinoculants for solving the problem of salinization of agricultural soils [38]. Association with bacilli stimulates plant immunity to stress by altering stress-sensitive genes, proteins, phytohormones and related metabolites. Substances that destroy cell walls from *Bacillus spp.* they can cause damage to pathogenic bacteria, fungi, nematodes, viruses and other pests by controlling their populations on plants. *Bacillus* strains secrete acidic metabolites that dissolve various mineral compounds, as well as polysaccharides that adsorb silicates [39]. Inoculation of *B. subtilis* improved the nutrition of sugar cane plants and the concentration of chlorophyll in them. As a result, even in conditions of drought, the parameters of gas exchange improved (especially the rate of net photosynthesis and the efficiency of water use). In addition, the parameters characterizing stress (activity of antioxidant metabolism) decreased in inoculated plants, which led to increased root growth, tillering, increased stem mass and increased sucrose concentration in stems [40]. The review by Lopes et al. [41] emphasizes that endophytic *Bacillus* species, as producers of biologically active compounds of biotechnological interest, are a valuable multifunctional set of tools that can be integrated with crop management methods to achieve higher yields.

The most studied representatives of the genus used in agriculture are *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, although other species have also demonstrated great potential [41, 2]. The article by Aloo and co-workers [42] discusses the unique properties of *B. rhizobacteria*, as well as various mechanisms of their impact, the practical use of which can contribute to the sustainability of agriculture. The decisive role of *B. firmus* SW5 is demonstrated in mitigating the adverse effects of high salinity on soybean growth and productivity by changing the architecture of the root system and induction of antioxidant defense systems, as well as the expression of stress-sensitive genes [43]. These organisms are also known as excellent phosphate solubilizers [44].

Strain differences of microorganisms are of great importance in increasing plant resistance in dry and salty environments. Thus, during the study of the bacterial community of endophytes of five plant species growing in the Tar desert in Pakistan, *Bacillus* strains were selected that are resistant to salt and heat stress, as well as antimicrobial activity. When they were tested on a non-host *Arabidopsis thaliana* plant, it was shown that *B. cereus* PK6-15, *B. subtilis* PK5-26 and *B. cycleans* PK3-109 significantly enhanced its growth under conditions of salt stress, doubling the levels of fresh mass compared to uninoculated plants. Other strains did not contribute to plant growth under normal conditions, but increased the fresh mass of plants by more than 50% compared to noninoculated plants under salt stress.

A study of a strain of *B. amyloliquefaciens* isolated from the endorhizosphere of *Salsamorpha borealis* showed that its use in stressful conditions improved the survival of inoculated pepper plants [45]. They retained a high content of chlorophyll, salicylic acid, sugar, amino acids and proline and demonstrated low lipid metabolism, abscisic acid, protein, hydrogen peroxide content and antioxidant activity both under salinity and drought conditions and under the influence of

heavy metals. It is also shown that *B. amyloliquefaciens* GJ1 can improve the immunity of citrus fruits by increasing photosynthesis and enhancing the expression of genes associated with resistance [46]. In the Lim and Kim study [47], capsicum plants treated with the *B. licheniformis* strain achieved greater shoot length and dry weight, as well as higher expression levels of four genes associated with drought and cold stress. It has been shown that the treatment of chickpeas by *B. subtilis*, *B. thuringiensis* and *B. megaterium* causes metabolic and physiological changes in plants that reduce the effects of drought [2]. When chickpeas are cultivated under controlled drought conditions, proline, L-arginine, L-histidine, L-isoleucine and tryptophan accumulate and a significant accumulation of riboflavin, L-asparagine, aspartate, glycerin, nicotinamide and 3-hydroxy-3-methylglutarate is induced, causing. The data obtained show that endophytic *Bacillus* strains represent an important genomic resource for deciphering plant growth stimulation issues at the molecular level [48].

Numerous species of *Paenibacillus* have also been considered for use as effective phytostimulators, biofertilizers and biocontrol agents [49]. The mechanisms used by these bacteria to increase bioavailability and/or facilitate the assimilation of nutrients by the host plant, modulation of plant hormones, stimulation of the host body's defense and stress resistance mechanisms, providing antagonistic action against pathogens and mitigating the effects of their effects on plant health are described. A comprehensive and systematic study of the mechanisms of their action in combination with field research can help in the search and selection of an effective biofertilizer and biocontrol agent.

It is also known that other soil bacteria, such as *Pseudomonas* and *Azospirillum*, relieve abiotic stresses in many types of crops, including rice [50]. Thus, soybean plants inoculated with *P. putida* H-2-3 reduced salinization and drought stress by increasing the content of chlorophyll, increasing the length and biomass of shoots, increasing the content of abscisic and salicylic acid, polyphenol, flavonoids, superoxide dismutase and 2,2-diphenyl-1-picryl. -hydrazyl hydrate of absorbing activity [51].

Rhizobacteria, in particular, *Enterobacter sp.* S16-3 and *Pseudomonas sp.* With 16-2O, they can colonize the surface of plant roots and mitigate the effect of salt stress by providing them with nitrogen, phosphates and potassium, as well as phytohormones such as auxin, cytokinin and abscisic acid. Due to inoculation with these bacteria, the content of malondialdehyde, H₂O₂ decreased and the indicators of antioxidant capacity, the content of proline and antioxidant enzymes increased [52].

When inoculating two varieties of *Burkholderia phytofirmans* corn under stressful drought conditions with two strains of bacterial endophytes *Pseudomonas* (PsJN) and *Enterobacter sp.* FD17, Naveed and collaborators [53] showed that bacterial inoculation minimized the effects of stress caused by drought, significantly increasing the biomass of shoots and roots, leaf area, chlorophyll content, photosynthesis and photochemical efficiency. Similarly, bacterized seedlings showed a higher relative water content in the leaves (30%) compared to the control, whereas uninoculated plants showed 43% higher leaf damage under drought stress.

In vitro testing of 44 bacterial isolates allowed us to identify four isolates with high salt resistance [54]. Among them, *B. subtilis* and *P. pseudoalcaligenes* demonstrated deaminase activity, production of siderophores and indoleacetic acid. They contributed to the induction of soybean resistance to salinization stress in hydroponics, increasing plant biomass, the relative content of water and osmolytics in shoots and roots. The concentration of Na⁺ in soybean plants treated with *P. pseudoalcaligenes* and exposed to NaCl significantly decreased. In soybean plants treated with *P. fluorescens*, under salt stress, compared with the control, the content of chlorophyll and plant-soluble proteins was reduced, and the content of proline was increased, while a more significant increase in the length of the stem and the weight of fresh shoots was recorded. That is, PGPR inoculation reduced the harmful effects of salinization stress [55]. It has also been shown that the corn plant has three drought-resistant bacterial strains of *Proteus penneri*, *P. aeruginosa* and *Alcaligenes faecalis* contributed to an increase in the relative content of water, protein and sugar by increasing the content of proline [56].

The mini-review by Liu and Zhang [57] shows how volatile organic compounds produced by PGPR increase plant resistance to salinization and drought, as well as the provision of sulfur and iron. Thus, the treatment of acacia seedlings of *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 with volatile organic compounds of the rhizobacterium *Robinia pseudoacacia* in the presence of NaCl showed that, unlike untreated seedlings, they had an increase in fresh weight, the number of lateral roots and the length of the primary root. In addition, an increase in the proline content and the activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase was observed in the leaves of the plant. It has also been shown that the strain of the salt-resistant rhizospheric bacterium *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 contributes to the accumulation in cells as the concentration of NaCl-compatible dissolved trehalose increases, which for it is the main mechanism of resistance to high salt concentrations. In addition, the JZ-GX1 strain produces indole-3-acetic acid and siderophores, dissolves inorganic phosphorus under salt stress, and also stimulates the synthesis of exopolysaccharides, which increases the ability of plants to resist salt stress [58]. The importance of exopolysaccharides for protecting plants from environmental fluctuations and abiotic stresses, such as drought, salinization or heavy metal pollution, as well as their role in plant-microbe interactions, are discussed in detail in the review by Morcillo and Manzanera [59].

The possibility of using endophytic bacteria as an alternative to chemical fertilizers and pesticides to increase plant productivity and mechanisms of protection against biotic and abiotic stress is confirmed in the work of Shah and co-authors [60]. Of the five strains of endophytic bacteria isolated from seeds of three different varieties of Pakistani wheat, two showed salt resistance after three days of incubation, and one of them showed a growth-stimulating effect on inoculated wheat plants.

Oxidative damage to proteins, lipids and nucleic acids is often observed with water stress. Some microorganisms can reduce these negative effects by producing antioxidant molecules or increasing the activity of antioxidant enzymes such as catalase or peroxidase [61]. Basil plants grown under conditions of water scarcity showed an increase in catalase activity during inoculation of *Pseudomonas* sp., both in monoculture and as part of a microbial consortium of *Pseudomonas* sp., *Bacillus latus* and *Azospirillum brasiliense*. In the latter case, the activity of glutathione peroxidase and ascorbate peroxidase also increased [62]. This combination of microbes has served as the basis for several successfully commercialized products, such as BFMS, Environmoc, SoilBiotics and HyperGalaxy.

Mushrooms. Some mechanisms of plant protection from lack of water are associated with the presence of fungi in their microbiome. Endophytes of eukaryotic plants in general often belong to the kingdom of fungi [63]. Some strains of fungi are more resistant to drought than bacteria, are able to provide many mechanisms of tolerance, and their number increases in these conditions. Fungi can be more effective than bacteria due to their growth characteristics and properties that allow them to intensively develop the soil, extract water and penetrate into plant tissues [64]. High indicators of drought resistance are provided in fungi due to the presence of a number of mechanisms for overcoming drought stress, including osmoprotectors, strong cell walls and melanin synthesis [65]. Filamentous fungi also produce extremely long hyphae, allowing them to extract water from hard-to-reach areas of the soil, which contributes to their activity even in very arid conditions. In addition, hyphae of fungal strains can absorb phosphorus and ammonium ions more efficiently than plant roots [66]. Fungi can also affect the hormonal balance of plants by producing phytohormones (auxins, gibberellins), as well as provide resistance to biotic and abiotic factors [67]. It is known that in some plants living in a hypersalinated coastal environment or on geothermal soils, survival is ensured by endophytic fungi [68].

Inoculation of plants with fungi isolated from extreme environments is a promising alternative for increasing productivity in stressful conditions arising from changing climatic conditions [69]. Thus, it was shown that plants infected with endophytic fungi increased height, weight, chlorophyll content, protein content, seed mass and their germination rate under conditions of thermal and arid stress [70,71].

The most studied are arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which successfully enter into symbiosis with many plants belonging to different families [72]. Studies have shown that symbiosis with arbuscular mycorrhiza (AM) reduces salt stress in different host plant species. As part of a symbiotic relationship, AMF helps host plants absorb nitrogen and phosphorus while simultaneously receiving carbon from their hosts. AMF plays an important role in the agricultural ecosystem, providing stimulation of plant growth, improving crop quality, increasing plant resistance to stress, stabilizing soil structure, maintaining ecological balance and sustainable agricultural development [73]. However, despite the abundant literature showing the mitigation of ion imbalance due to AM-symbiosis, the molecular mechanisms involved have not been practically investigated.

In experiments by Qin and co-authors [74], peanut seeds inoculated with AMF *Rhizophagus correctis* SA and *Funneliformis mosseae* BEG95 showed higher net photosynthesis rates, relative leaf moisture, osmolytic accumulation, antioxidant enzyme activity, plant height and yield, both under normal conditions and under salinization conditions.

Among fungi, representatives of the genus *Trichoderma* differ in the fight against damaging effects in plants [22, 75, 76]. Thus, *T. harzianum* is an antagonistic mycoparasite that colonizes the roots of both monocotyledonous and dicotyledonous plants, stimulating an increase in their absorption of nutrients and strengthening their water-retaining ability [77], promotes their better growth and development in soils prone to drought [78]. *Trichoderma* helps plants withstand drought stress by increasing the expression of antioxidant enzymes, secondary metabolites and hormones [79-80]. Similarly, colonization of *Theobroma cacao* by the fungus *Trichoderma hamatum* DIS 219b contributed to an increase in root mass and moisture content. At the same time, the stimulation effect is manifested both in conditions of drought and without it [78].

Another type of fungi that make up part of the beneficial plant microbiome are yeasts, which can be used to control deciduous infections through direct antagonism, induction of systemic resistance, or stimulation of root development [81]. Silambarasan and co-authors [82] demonstrated the ability of exopolysaccharides produced by yeast to promote the formation of stable aggregates that improve water conservation in the soil. In addition, the use of yeast can activate soil enzymes under drought stress, which increases the nutrient content in it, and also improves the osmotic state of roots and the activity of antioxidant enzymes in plants [83].

The association of AMF with plants is the most common, but the exact mechanisms of its role in the nutrient cycle and their transformation are not yet fully understood. The development of biotechnological techniques using AMF is one of the most environmentally friendly alternatives in the context of sustainable agriculture [84, 85].

The combined influence of fungi and bacteria. Arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria can interact synergistically, stimulating plant growth through a number of mechanisms that include improving nutrient uptake and inhibiting fungal plant pathogens. These interactions may be crucial for the development of sustainable, low-cost agricultural systems that rely on biological processes to maintain soil fertility and plant health. The Miransari review [86] presents data concerning the interaction between arbuscular mycorrhiza fungi and soil bacteria, as well as some new ideas for future research. It is assumed that associations of crops with AMF, as well as nitrogen-fixing bacteria, can serve as an alternative and sustainable strategy for increasing yields in saline fields [87]. It has been shown that the joint inoculation of AMF with phosphate-solubilizing bacteria promotes the growth and increase of sunflower yield [88]. Bizo [89] considered the role of AMF in combination with endophytic bacteria *P. fluorescens* and *Bacillus sp.*, solubilizing potassium and phosphorus, as well as species of fungi *Trichoderma sp.* as the most effective biocontrol agents against diseases of olive trees (for example, verticillose wilt, root rot and anthracnose). The use of AMF together with phosphate-solubilizing bacteria in the cultivation of beach plum in saline soils, mitigated the effect of salt stress on all growth parameters and nutrient absorption, especially root growth. At the same time, a significant decrease in the rate of photosynthesis, stomatal conductivity, and transpiration rate was also prevented [90].

Due to the high variability of the environment, the use of various microorganisms in one biological product allows for more effective protection of plants. The final desired effect depends on the appropriate level of interaction of microorganisms both among themselves and with the plant. The correct combination of fungal and bacterial strains increases efficiency and reliability, and seems particularly promising [91]. For their successful practical application, it is necessary to work on the development of consortia and determine their stability, and, consequently, their effectiveness in the long term when used in the field. There are many scientific and regulatory hurdles to overcome before this technology is widely recognized and widely used [92].

Salt-resistant PGPR. Microbes have been isolated from extremely alkaline, saline and sodium soils that are able to survive under osmotic and ionic stress, and many of them mitigate various biotic and abiotic stresses in plants. In the last few years, their potential in increasing the productivity of crops facing salt stress has been investigated on the basis of a clear assumption that salt-resistant PGPR can be used in reclamation of saline agroecosystems. Their potential in increasing plant productivity under these conditions is considered in the review by Egamberdieva and co-authors [93].

In non-salt-resistant PGPR, which have a positive effect on plants under normal conditions, protective properties are lost with increasing salinity of the medium. Salt-resistant PGPR are distinguished by the presence of numerous mechanisms that affect the physiological, biochemical and molecular reactions of plants and help them cope with salt stress. These mechanisms include osmotic regulation due to ion homeostasis and osmolytic accumulation, protection from free radicals due to the formation of free radical trapping enzymes, reactions to oxidative stress and maintenance of growth parameters due to the synthesis of phytohormones and other metabolites. They contribute to the production of nutrients, chelation of metals, maintenance of water balance and ion homeostasis, production of phytohormones, exopolysaccharides, volatile organic compounds and antioxidant enzymes that trigger stress-sensitive genes at high salt concentrations [94,95].

Rhizobacteria isolated from stress-prone habitats have been recognized as the most effective microorganisms in increasing plant resistance [93]. Similarly, the constitutive microbial communities of agave [96] and cacti [97] probably contribute to the survival of these plants in very arid habitats. Studies by Etesami and Beattie [98], as well as Hajiabadi and co-authors [99] have shown that halophilic PGPR from the rhizosphere of halophytic plant species can be effective bioinoculants for the successful production of non-halophytic plant species in saline soils. Since salt-resistant PGPR contribute to better survival of plants during salinization, they are potential candidates for increasing agricultural productivity [100].

Conclusion

The most effective strategy for adapting plants and increasing their resistance to abiotic stresses is generally recognized as an environmentally friendly way of interacting plants with microbes, allowing plants to cope with adverse stressful environmental conditions. The microbial consortium functioning in the root microbiome promotes plant growth by increasing the regulation of stress resistance genes, as well as by regulating the synthesis of phytohormones, osmolytics, improving the absorption of nutrients and strengthening the antioxidant system. To date, more than 20 genes of endophytism, about 50 genes of direct stimulation of plant growth, about 25 genes of biological activity and about 10 genes of mitigation of various stresses have been revealed in various bacterial endophytes using modern research methods [30]. Selection, screening and application of stress-resistant microorganisms can become viable options to help overcome the limitations of crop productivity in areas subject to abiotic stress [101,102].

However, despite their high potential in crop production, their practical application affects only a few species, and most rhizobacteria are not widely distributed. The reviews of Chitnis with co-authors [103] and Naing with co-authors [104] emphasize the importance of compatibility of active endophyte strains with specific host plants and their microbiomes. To achieve stable results, future research should be aimed at a more detailed study of plant microbiomes and at the selection

of beneficial microbes in local field conditions [105]. A comprehensive understanding of plant-PGPR-AMF-soil interactions will pave the way for the effective use of microorganisms to counteract the stresses of salinization and drought [106]. The study of the economics and complex metabolism of endophytes and plants will make it possible to use the results of their productive association more fully [107].

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 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, 11, 163. (doi:10.1186/1471-2229-11-163)
- 2 Khan N., Bano A., Rahman M. A., Guo J., Kang Z., Babar M. A. Comparative Physiological and Metabolic Analysis Reveals a Complex Mechanism Involved in Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Induced by PGPR and PGRs *Scientific Reports* 2019, vol. 9, Article number: 2097.
- 3 Ha-Tran D.M., Nguyen T. T. M., Hung S.-H., Huang E., Huang C.-C. Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Stimulating Salinity Stress Defense in Plants: A Review *Int J Mol Sci.* 2021; 22(6):3154. (doi:10.3390/ijms22063154)
- 4 Gul Z., Tang Z.-H., Arif M., Ye Z. An Insight into Abiotic Stress and Influx Tolerance Mechanisms in Plants to Cope in Saline Environments *Biology (Basel)*.2022; 11(4):597. (doi: 10.3390/biology11040597.)
- 5 Jiménez-Mejía, R.; Medina-Estrada, R.I.; Carballar-Hernández, S.; Orozco-Mosqueda, M.d.C.; Santoyo, G.; Loeza-Lara, P.D. Teamwork to Survive in Hostile Soils: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Ameliorate Soil Salinity Stress in Crops. *Microorganisms* 2022, 10, 150. (doi: 10.3390/microorganisms10010150)
- 6 Gupta A., Mishra R., Rai S., Bano A., Pathak N., Fujita M., Kumar M., Hasanuzzaman M. Mechanistic Insights of Plant Growth Promoting Bacteria Mediated Drought and Salt Stress Tolerance in Plants for Sustainable Agriculture *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3741. (doi:10.3390/ijms23073741)
- 7 Mashabela M. D., Piater L. A., Dubery I. A., Tugizimana F., Mhlongo M. I. Rhizosphere Tripartite Interactions and PGPR-Mediated Metabolic Reprogramming towards ISR and Plant Priming: A Metabolomics Review *Biology* 2022, 11(3), 346. (doi.org/10.3390/biology11030346)
- 8 Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies Front. *Plant Sci.*, 2017 Sec. *Functional Plant Ecology*. (doi.org/10.3389/fpls.2017.00172)
- 9 Judith Naamala , Donald L Smith, Microbial Derived Compounds Are a Promising Approach to Mitigating Salinity Stress in Agricultural Crops Front *Microbiol.* 2021 Nov 19;12:765320. (doi: 10.3389/fmicb.2021.765320)
- 10 AFSHAN R., Korejo F, Sultana V, Ara J, Ehteshamulhaque SYED. Induction of systemic resistance in cotton by the plant growth promoting rhizobacterium and seaweed against charcoal rot disease. *Pak. J. Bot.* 2017; 49:347–353.
- 11 Moustakas M., Sperdouli I., Kouna T., Antonopoulou C. I., Therios I. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regul.* 2011. 65 315–325. (doi: 10.1007/s10725-011-9604-z)
- 12 Labudda M. Lipid Peroxidation as a Biochemical Marker for Oxidative Stress During Drought. *An Effective Tool for Plant Breeding*. 2013. Poland: E-wydawnictwo. (doi:10.1007/s10725-011-9604-z)
- 13 Natarajan S. K., Zhu W., Liang X., Zhang L., Demers A. J., Zimmerman M. C, Simpson M. A., Becker D. F Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death Free Radic Biol Med. 2012; 53(5):1181-91. (doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.002)
- 14 Zhang Y., Rui C., Fan Y., Xu N., Zhang H., Wang J., Sun L., Dai M., Ni K., Chen X., Lu X., Wang D., Wang J., Wang S., Guo L., Zhao L., Feng X., Chen C., Ye W. Identification of SNAT Family Genes Suggests GhSNAT3D Functional Reponse to Melatonin Synthesis Under Salinity Stress in Cotton Front *Mol Biosci.* 2022; 9:843814. (doi:10.3389/fmolb.2022.843814)
- 15 Wani S. H., Kumar V., Shriram V., Sah S. K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 2016. 4 162–176. (doi: 0.1016/j.cj.2016.01.010)
- 16 Nguyen, V. T.; Nguyen, T. K. D., 2016. A response of feed intake, carcass value and economic return of crossbred rabbits (New Zealand x local) to the mixed or separate feedings. Proc. *11th World Rabbit Congress*, June 15-18 2016, Qingdao, China: 455-458

- 17 Verma S.K., Sahu P.K., Kumar K., Pal G., Gond S.K., Kharwar R.N., White J.F. Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance *Journal of Applied Microbiology* 2021 Vol. 131, Issue 5 p. 2161-2177 (doi: 10.1111/jam.15111)
- 18 Burragoni S. G., Jeon J. Applications of endophytic microbes in agriculture, biotechnology, medicine, and beyond *Microbiological Research* 2021, Vol. 245, 126691 (doi:10.1016/j.micres.2020.126691)
- 19 Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 2012. 17 478–486. (doi :10.1016/j.tplants.2012.04.001)
- 20 White, J. F., Kingsley, K. I., Kowalski, K. P., Irizarry, I., Micci, A., Soares, M. A. Disease protection and allelopathic interactions of seed transmitted endophytic Pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). *Plant. Soil.* 2017. 422, 195–208. (doi: 10.1007/s11104-016-3169-6)
- 21 Vardharajula S., Ali S. Z., Grover M., Reddy G., Bandi V. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress *Journal of Plant Interactions* 2011, Vol. 6, - Issue 1 P. 1-14 (doi:10.1080/17429145.2010.535178)
- 22 Jay A.K., Verma P. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review: *Microbiological Research* 2018, Vol. 207, P. 41-52 (doi:10.1016/j.micres.2017.11.004)
- 23 Gamalero, E.; Glick, B.R. Recent Advances in Bacterial Amelioration of Plant Drought and Salt Stress. *Biology* 2022, 11, 437. (doi:10.3390/biology11030437)
- 24 Bilal, S., Khan, A. L., Shahzad, R., Asaf, S., Kang, S. M., and Lee, I. J. Endophytic *Paecilomyces formosus* LHL10 augments *Glycinemax* L. adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. *Front. Plant Sci.* 2017. 8:870. (doi: 10.3389/fpls.2017.00870)
- 25 Kearl J., McNary C., Lowman J S., Mei C., Aanderud Z. T., Smith S. T., West J., Colton E., Hamson M., Nielsen B. L Salt-Tolerant Halophyte Rhizosphere Bacteria Stimulate Growth of Alfalfa in Salty Soil *Front Microbiol.* 2019; 10:1849. (doi: 10.3389/fmicb.2019.01849)
- 26 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. 119, 211–223. (doi: 10.1016/j.plaphy.2017.08.029)
- 27 Zou, P., Lu, X., Jing, C., Yuan, Y., Lu, Y., Zhang, C., et al. Low-molecular-weight polysaccharides from *pyropia yezoensis* enhance tolerance of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) to salt stress. *Front. Plant Sci.* 2018. 9, 427. (doi: 10.3389/fpls.2018.00427)
- 28 Bhattacharyya, P. N., Jha, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. 28 (4), 1327–1350. (doi: 10.1007/s11274-011-0979-9)
- 29 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. J.* 2012. 31 (2), 152–164. (doi: 10.5423/PPJ.OA.12.2014.0136)
- 30 Dudeja S. S., Suneja-Madan P., Pau M., Maheswari R., Kothe E. Bacterial endophytes: Molecular interactions with their hosts *J Basic Microbiol.* 2021; 61(6):475-505. (doi: 10.1002/jobm.202000657.)
- 31 Morales-Cedeño L. R., Orozco-Mosqueda M. D. C., Loeza-Lara P. D., Parra-Cota F. I., de Los Santos-Villalobos S., Santoyo G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives *Microbiol Res.* 2021; 242:126612. (doi: 10.1016/j.micres.2020.126612.)
- 32 Adedayo, A.A.; Babalola, O.O.; Prigent-Combaret, C.; Cruz, C.; Stefan, M.; Kutu, F.; Glick, B.R. The Application of Plant GrowthPromoting Rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* Production in the Agricultural System: A Review. *PeerJ* 2022, 10, e13405.
- 33 Yadav, A.N.; Kumar, V.; Dhaliwal, H.S.; Prasad, R.; Saxena, A.K. Microbiome in Crops: Diversity, Distribution, and Poten-tial Role in Crop Improvement. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 305–332.
- 34 Kour, D.; Rana, K.L.; Kaur, T.; Sheikh, I.; Yadav, A.N.; Kumar, V.; Dhaliwal, H.S.; Saxena, A.K. Microbe-Mediated Alleviation of Drought Stress and Acquisition of Phosphorus in Great Millet (*Sorghum bicolor* L.) by Drought-Adaptive and Phos-phorusSolubilizing Microbes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020, 23, 101501.
- 35 Liszka M. J., Clark M. E., Schneider E., Clark D. S. Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2012 Vol. 3:77-102. (doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114239)

- 36 Hamdia, A. B. E., Shaddad, M. A. K., Doaa, M. M. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasiliense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regul.* 2004; 44 (2), 165–174. (doi: 10.1023/B:GROW.0000049414.03099.9b)
- 37 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; 6, 34768. (doi: 10.1038/srep34768)
- 38 Orozco-Mosqueda M. D. C., Glick B. R, Santoyo G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops *Microbiol Res.* 2020; 235:126439. (doi: 10.1016/j.micres.2020.126439)
- 39 Radhakrishnan R., Hashem A., Abd Allah E. F Bacillus: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments *Review Front Physiol.* 2017; 8:667. (doi: 10.3389/fphys.2017.00667)
- 40 Fonseca-García C., Coleman-Derr D., Garrido E., Visel A., Tringe S. G., Partida-Martínez L. P. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity . *Front Microbiol.* 2016; 7: 150. (doi: 10.3389/fmicb.2016.00150)
- 41 Lopes R., Tsui S., Gonçalves P. J R O, de Queiroz M. V. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants *World J Microbiol Biotechnol.* 2018; 34(7):94. (doi: 10.1007/s11274-018-2479-7.)
- 42 Aloo B N, Makumba B A, Mbega E R The potential of *Bacilli* rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability *Microbiol Res.* 2019; 219:26-39. (doi: 10.1016/j.micres.2018.10.011.)
- 43 El-Esawi M. A, Alaraidh I. A, Alsahli A. A, Alamri S. A, Ali H. M, Alayafi A. A *Bacillus firmus* (SW5) augments salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating root system architecture, antioxidant defense systems and stress-responsive genes expression *Plant Physiol Biochem.* 2018; 132:375-384. (doi: 10.1016/j.plaphy.2018.09.026.)
- 44 Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd Allah, E.F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Front. Physiol.* 2017, 8, 667. (doi.org/10.3389/fphys.2017.00667)
- 45 Kazerooni E. A., Maharachchikumbura S. S. N., Adhikari A., Al-Sadi A. M., Kang S.-M., Kim L.-R., Lee I.-J. Rhizospheric *Bacillus amyloliquefaciens* Protects *Capsicum annuum* cv. Geumsugangsan From Multiple Abiotic Stresses via Multifarious Plant Growth-Promoting Attributes *Front. Plant Sci.*, 2021, (doi.org/10.3389/fpls.2021.669693)
- 46 Nan J., Zhang S., Jiang L. Antibacterial Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* GJ1 against Citrus Huanglongbing Plants (Basel). 2021; 10(2):261. (doi: 10.3390/plants10020261)
- 47 Lim, J.H.; Kim, S.D. Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *Plant Pathol. J.* 2013, 29, 201–208. (doi: 10.5423/PPJ.SI.02.2013.0021)
- 48 Bokhari A., Essack M., Lafi F. F., Andres-Barrao C., Jalal R., Alamoudi S., Razali R., Alzubaidy H., Shah K. H., Siddique S., Bajic V. B., Hirt H., Saad M. M. Author Correction: Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance *Sci Rep.* 2020; 10: 3001. (doi: 10.1038/s41598-020-58957-w)
- 49 Soni R., Keharia H. Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming *Bacilli* *Planta*. 2021; 254(3):49. (doi: 10.1007/s00425-021-03695-0.)
- 50 Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Boyce A. N. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review *Molecules* 2016, 21, 573; (doi:10.3390/molecules21050573)
- 51 Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kim, M. J., Park, J. M., Kim, B. R., et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 2014, 84, 115–124. (doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.001)
- 52 Neshat M., Abbasi A., Hosseinzadeh A., Sarikhani M.R., Dadashi Chavan D., Rasoulnia A. Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. *Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology*, 2022, 28(2):347-361 (doi: 10.1007/s12298-022-01128-0)
- 53 Naveed M., Mitter B., Reichenauer T. G., Wieczorek K., Sessitsch A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter*

sp. FD17 *Environmental and Experimental Botany* 2014, Vol. 97, P. 30-39
 (doi:10.1016/j.envexpbot.2013.09.014)

54 Yasmin H., Naeem S., Bakhtawar M., Jabeen Z., Nosheen A., Naz R., Keyani R., Mumtaz S., Hassan M. N. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max L.*) against salinity stress *PLoS One*. 2020; 15(4):e0231348. (doi: 10.1371/journal.pone.0231348.)

55 Abulfaraj A. A., Jalal R. S. Use of plant growth-promoting bacteria to enhance salinity stress in soybean *Glycine max L.* plants *Saudi J Biol Sci.* 2021; 28(7):3823-3834. (doi: 10.1016/j.sjbs.2021.03.053.)

56 Naseem H., Bano A. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize, 2014 (doi:10.1080/17429145.2014.902125)

57 Liu X.-M., Zhang H. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance *Front Plant Sci.* 2015; 6:774. (doi: 10.3389/fpls.2015.00774.)

58 Li P.-S., Kong W.-L., Wu X.-Q., Zhang Y. Volatile Organic Compounds of the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria JZ-GX1 Enhanced the Tolerance of *Robinia pseudoacacia* to Salt Stress *Front Plant Sci.* 2021; 12:753332. (doi: 10.3389/fpls.2021.753332.)

59 Morcillo R. J L, Manzanera M. The Effects of Plant-Associated Bacterial Exopolysaccharides on Plant Abiotic Stress Tolerance Metabolites. 2021; 11(6):337. (doi: 10.3390/metabo11060337)

60 Shah D., Khan M. S., Aziz S., Ali H., Pecoraro L. Molecular and Biochemical Characterization, Antimicrobial Activity, Stress Tolerance, and Plant Growth-Promoting Effect of Endophytic Bacteria Isolated from Wheat Varieties. *Microorganisms* 2022, 10(1), 21; (doi:10.3390/microorganisms10010021)

61 Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 2016, 184, 13–24. (doi: 10.1016/j.micres.2015.12.003)

62 Heidari, M., Golpayegani, A. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum L.*). *J. Saudi Soc. Agr. Sci.* 2012, 11, 57–61. (doi:10.1016/j.jssas.2011.09.001)

63 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, 9, 1729. (doi:10.3390/ microorganisms9081729)

64 Hanaka, A.; Ozimek, E.; Reszczyńska, E.; Jaroszuk-Sciseł, J.; Stolarz, M. Plant Tolerance to Drought Stress in the Presence of Supporting Bacteria and Fungi: An Efficient Strategy in Horticulture. *Horticulturae* 2021, 7, 390. (doi:10.3390/horticulturae7100390)

65 Jiménez-Arias, D.; García-Machado, F.J.; Morales-Sierra, S.; García-García, A.L.; Herrera, A.J.; Valdés, F.; Luis, J.C.; Borges, A.A. A beginner's guide to osmoprotection by biostimulants. *Plants* 2021, 10, 363. (doi:10.3390/plants10020363)

66 Matias, S.R.; Pagano, M.C.; Muzzi, F.C.; Oliveira, C.A.; Carneiro, A.A.; Horta, S.N.; Scotti, M.R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *Eur. J. Soil Biol.* 2009, 45, 259–266. (doi:10.1016/j.ecolind.2010.09.001)

67 Dreischhoff, S., Das, I.S., Jakobi, M., Kasper, K., Polle, A. Local responses and systemic induced resistance mediated by ectomycorrhizal fungi. *Front. Plant Sci.* 2020, 11, 590063 (doi:10.3389/fpls.2020.590063)

68 Rodriguez R. J., White J. F. Jr, Arnold, A. E. Redman R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles *New Physiologist* 2009, Vol.182, Issue2 P. 314-330 (doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x)

69 Acuña-Rodríguez, I.S., Ballesteros, G.I., Atala, C., Gundel, P.E., Molina-Montenegro, M.A. Hardening Blueberry Plants to Face Drought and Cold Events by the Application of Fungal Endophytes. *Agronomy* 2022, 12, 1000. (doi:10.3390/agronomy12051000)

70 Bilal, S., Khan, A. L., Shahzad, R., Asaf, S., Kang, S. M., and Lee, I. J. Endophytic *Paecilomyces formosus* LHL10 augments *Glycinemax L.* adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. *Front. Plant Sci.* 2017. 8:870. (doi: 10.3389/fpls.2017.00870)

71 Khan, A. L., Shin, J. H., Jung, H. Y., Lee, I. J. Regulations of capsaicin synthesis in *Capsicum annuum L.* by *Penicillium resedanum* LK6 during drought conditions. *Sci. Horti.* 2014. 175, 167–173. (doi: 10.1016/j.scientia.2014.06.008)

72 Adamec, S.; Andrejiová, A. Mycorrhiza and stress tolerance of vegetables: A review. *Acta Hortic. Regiotect.* 2018, 21, 30–35. (doi: 10.2478/ahr-2018-0008)

73 Yang W.-Y., Sun L.-Y., Song F.-B., Yang X.-Q., Zhang M.-J., Li S.-X., Zhu X.-C. [Research advances in species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in terrestrial agro-ecosystem] *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 2019; 30(11):3971-3979. (doi: 10.13287/j.1001-9332.201911.036.)

74 Qin W., Yan H., Zou B., Guo R., Ci D., Tang Zh., Zou X., Zhang X., Yu X., Wang Y., Si T., Qin W., Yan H., Zou B., Guo R., Ci D., Tang Z., Zou X., Zhang X., Yu X., Wang Y., Si T. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate salinity stress in peanut: Evidence from pot-grown and field experiments. *Food and Energy Security* 2021 Vol,10, Issue4 e314 (doi:10.1002/fes.3.314)

75 Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., et al. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus. *Microb. Pathog.* 129, 7–18. (doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.042)

76 Szczałba, M., Kopta, T., Gaśtoł, M., and Sêkara, A. (2019). Comprehensive insight into arbuscular mycorrhizal fungi, Trichoderma spp. and plant multilevel interactions with emphasis on biostimulation of horticultural crops. *J. Appl. Microbiol.* 127, 630–647. (doi: 10.1111/jam.14247)

77 Doni F., Isahak A., Radziah C., Zain C. M., Mohtar W., Yusoff W. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to Trichoderma spp. *Inoculants Research article AMB Express* 2014, 4, 45. (doi: 10.1186/s13568-014-0045-8)

78 Bae H., Sicher R. C., Kim M. S, Kim S.-H., Strem M. D, Melnick R. L, Bailey B. A. The beneficial endophyte Trichoderma hamatum isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao* *J Exp Bot.* 2009; 60(11):3279-95. (doi: 10.1093/jxb/erp165.)

79 Pandey V., Ansari M.W., Tula S., Yadav S., Sahoo R.K. , Shukla N., Bains G., S. Badal, Chandra S., Gaur A.K. , Kumar A., Shukla A., Kumar J., Tuteja N. Dose-dependent response of Trichoderma harzianum in improving drought tolerance in rice genotypes *Planta*, 2016, 243, 1251-1264. (doi: 10.1007/s00425-016-2482-x.)

80 Alwhibi1 M. S., Hashem A., Abd_Allah E. F., Alqarawi A. A., Soliman D. W. K., Wirth S., Egamberdieva D. Increased resistance of drought by Trichoderma harzianum fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture* 2017, 16(8): 1751–1757.

81 Fadiji A. E., Babalola O. O., Santoyo G., Perazzolli M. The Potential Role of Microbial Biostimulants in the Amelioration of Climate Change-Associated Abiotic Stresses on Crops Front. *Microbiol.*, 14 January 2022 Sec. Microbial Symbioses. (doi:10.3389/fmicb.2021.829099)

82 Silambarasan, S.; Logeswari, P.; Cornejo, P.; Kannan, V.R. Evaluation of the Production of Exopolysaccharide by Plant Growth Promoting Yeast Rhodotorula sp. Strain CAH2 under Abiotic Stress Conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 121, 55–62. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016)

83 Alzandi, A.A.; Naguib, D.M. Effect of Yeast Application on Soil Health and Root Metabolic Status of Corn Seedlings under Drought Stress. *Arch. Microbiol.* 2022. (doi: 10.1007/s00203-022-02843-8)

84 Borie, F.; Aguilera, P.; Castillo, C.; Valentine, A.; Seguel, A.; Barea, J.M.; Cornejo, P. Revisiting the Nature of Phosphorus Pools in Chilean Volcanic Soils as a Basis for Arbuscular Mycorrhizal Management in Plant P Acquisition. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2019, 19, 390–401. (doi: 10.1007/s42729-019-00041-y)

85 Seguel, A.; Meier, F.; Azcón, R.; Valentine, A.; Meriño-Gergichevich, C.; Cornejo, P.; Aguilera, P.; Borie, F. Showing Their Mettle: Extraradical Mycelia of Arbuscular Mycorrhizae Form a Metal Filter to Improve Host Al Tolerance and P Nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 2020, 100, 803–810. (doi:10.1002/jsfa.10088)

86 Miransari M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 89(4):917-30. (doi: 10.1007/s00253-010-3004-6.)

87 Hanin M., Ebel C., Ngom M., Laurent L., Masmoudi K. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7, 1787 (doi:10.3389/fpls.2016.01787)

88 Nacoon S., Jogloy S., Riddech N., Mongkolthanaruk W., Ekprasert J., Cooper J., Boonlue S. Combination of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria on growth and production of *Helianthus tuberosus* under field condition *Sci Rep.* 2021, 11(1):6501. (doi: 10.1038/s41598-021-86042-3.)

89 Bizos, G., Papatheodorou, E.M., Chatzistathis, T., Ntalli, N., Aschonitis, V.G., Monokrousos, N. The role of microbial inoculants on plant protection, growth stimulation, and crop productivity of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plants* 2020, 9, 743. (doi:10.3390/plants9060743)

90 Zai X.-M., Fan J.-J., Hao Z.-P., Liu X.-M., Zhang W.-X. Effect of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing fungi on nutrient uptake and photosynthesis of beach palm under salt stress environment *Sci Rep.* 2021; 11(1):5761. (doi:10.1038/s41598-021-84284-9.)

91 Hanaka, A., Ozimek, E., Reszczyńska, E., Jaroszuk-Scisłej, J., Stolarz, M. Plant Tolerance to Drought Stress in the Presence of Supporting Bacteria and Fungi: An Efficient Strategy in Horticulture. *Horticulturae* 2021, 7, 390. (doi:10.3390/horticulturae7100390)

92 Gamalero, E.; Glick, B.R. Recent Advances in Bacterial Amelioration of Plant Drought and Salt Stress. *Biology* 2022, 11, 437. (doi:10.3390/biology11030437)

93 Egamberdieva D., Wirth S., Bellingrath-Kimura S. D., Mishra J., Arora N. K. Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils 2019/12/18 *Frontiers in microbiology* 10: 2791 (doi:10.3389/fmicb.2019.02791)

94 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.*, 07 July 2020 *Sec. Microbiotechnology* (doi:10.3389/fmicb.2020.01216)

95 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 | (doi:10.3389/fmicb.2021.660075)

96 Coleman-Derr D., Desgarennes D., Fonseca-Garcia C., Gross S., Clingenpeel S., Woyke T., North G., Visel A., Partida-Martinez L. P., Tringe S. G. Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species *New Phytol.* 2016; 209(2):798-811. (doi: 10.1111/nph.13697)

97 Fonseca-García C., Coleman-Derr D., Garrido E., Visel A., Tringe S. G., Partida-Martínez L. P. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity *Front Microbiol.* 2016; 7: 150. (doi: 10.3389/fmicb.2016.00150) PMCID: PMC4751269 PMID: 26904020

98 Etesami H., Beattie G. A. Mining Halophytes for Plant Growth-Promoting Halotolerant Bacteria to Enhance the Salinity Tolerance of Non-halophytic Crops *Front Microbiol.* 2018; 9: 148. (doi: 10.3389/fmicb.2018.00148)

99 Hajiabadi A. A., Arani A. M., Ghasemi S., Rad M. H., Etesami H., Manshadi S. S., Dolati A. Mining the rhizosphere of halophytic rangeland plants for halotolerant bacteria to improve growth and yield of salinity-stressed wheat *Plant Physiol Biochem.* 2021; 163:139-153. (doi: 10.1016/j.plaphy.2021.03.059.)

100 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; 252:126861. (doi: 10.1016/j.micres.2021.126861)

101 Morales-Cedeño L. R., Orozco-Mosqueda M. D. C., Loeza-Lara P. D., Parra-Cota F. I., de Los Santos-Villalobos S., Santoyo G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives *Microbiol Res.* 2021; 242:126612. (doi: 10.1016/j.micres.2020.126612.)

102 Rana K. L., Kour D., Kaur T., Devi R., Yadav A. N., Yadav N., Dhaliwal H. S., Saxena A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability *Antonie Van Leeuwenhoek* 2020; 113(8):1075-1107. (doi: 10.1007/s10482-020-01429-y.)

103 Chitnis V.R., Suryanarayanan T.S., Nataraja K.N., Prasad S. R., Oelmüller R., Shaanker R. U. Fungal Endophyte-Mediated Crop Improvement: The Way Ahead *Front. Plant Sci.*, 2020 | (doi:10.3389/fpls.2020.561007)

104 Naing A. H., Maung T.-T., Kim C. K. The ACC deaminase-producing plant growth-promoting bacteria: Influences of bacterial strains and ACC deaminase activities in plant tolerance to abiotic stress *Physiol Plant.* 2021; 173(4):1992-2012. (doi: 10.1111/ppl.13545.)

105 Sangiorgio D., Cellini A., Donati I., Pastore C., Onofrietti C., Spinelli F. Facing Climate Change: Application of Microbial Biostimulants to Mitigate Stress in Horticultural Crops *Agronomy* 2020, 10, 794. (doi:10.3390/agronomy10060794)

106 Sagar, A.; Rathore, P.; Ramteke, P.W.; Ramakrishna, W.; Reddy, M.S.; Pecoraro, L. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Their Synergistic Interactions to Counteract the Negative Effects of Saline Soil on Agriculture: Key Macromolecules and Mechanisms. *Microorganisms* 2021, 9, 1491. (doi:10.3390/ microorganisms9071491)

107 Khare E., Mishra J., Arora N. K. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front. Microbiol.*, 2018 (doi:10.3389/fmicb.2018.02732)

МРНТИ: 68.03.07

А.К. САДАНОВ¹, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА^{1*}, Э.Т. ИСМАИЛОВА¹,
О.Н. ШЕМШУРА¹, Б.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Н.А. БИСЬКО²,
А.Е. МОЛЖИГИТОВА¹, А.Е. ЕЛУБАЕВА¹, Д.А. ТЛЕУБЕКОВА¹

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

²Институт ботаники имени Н.Г. Холодного, Киев, Украина

*e-mail: msyban@mail.ru

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ОЖОГ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.02

Аннотация

Настоящий обзор посвящен бактериальному ожогу плодовых культур, который является опасным карантинным заболеванием, наносящим огромный экономический ущерб по всему миру. Заболевание распространилось более чем в 50 странах с момента его открытия в 1870-е годы. Возбудитель заболевания *Erwinia amylovora* включен в единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза. Данное заболевание вызывает серьезное поражение или гибель плодовых деревьев в питомниках, садах, замедление наступления плодоношения у молодых деревьев, потери урожая.

Ключевые слова: бактериальный ожог, плодовые культуры, *Erwinia amylovora*, меры борьбы.

Бактериальный ожог плодовых культур является наиболее опасным заболеванием плодовых культур. Впервые заболевание было описано в 1780 г. в Северной Америке. В 1924 году болезнь проникла в Италию и широко распространялась по всей территории Европы. К настоящему времени заболевание выявлено в 50 странах мира [1,2]. Бактериальный ожог обнаружен и в странах бывшего СССР, в том числе России, Белоруссии, Украине, Молдавии, Латвии, Казахстане, Киргизии [3,4]. На территории Казахстана бактериальный ожог был впервые зарегистрирован в начале 2000-х годов и его ареал из года в год расширяется. За последние семь лет площади садов, зараженные данной болезнью, выросли в 40 раз. Это связано с благоприятными для развития болезни природно-климатическими условиями (умеренная температура и высокая влажность воздуха), особенно на юге и юго-востоке Казахстана, являющихся основными зонами выращивания плодовых культур. На сегодняшний день, по данным Агентства по статистике Республики Казахстан, занятая площадь под посадками яблони и груши составляет свыше 36 000 га, из них около 3 100 га занимает сорт яблони «Апорт». Зараженная бактериальным ожогом площадь составляет 419,9 га, в том числе по областям: в Алматинской – 342,0 га, Жамбылской-72,6 га и Туркестанской -5,3 га.

Симптомы заболевания начинают проявляться на верхушках деревьев, затем переходят на более крупные ветки, а впоследствии распространяются на ствол и даже корни растения, вызывая отмирание всего дерева [5-7]. Наиболее подвержены заражению цветки, однолетние побеги и молодые завязи. Первые симптомы заболевания начинают проявляться весной во время цветения. На листьях вначале появляются небольшие красноватые (у яблони) и темно-бурые (у груши) некрозы между жилками, которые распространяются к периферии, увеличиваясь в размере [8]. Молодые зеленые побеги увядают, а верхушки их загибаются в виде посоха. Пораженные цветки и листья не опадают, долго оставаясь на ветвях, напоминая опаленные после пожара деревья (рисунок 1, а, б). Отсюда и название заболевания – «ожог». Сначала инфицированная ткань становится блестящей и покрывается маслянистой субстанцией, затем некротизируется и ссыхается [9]. Во влажную погоду наблюдается обильное выделение бактериального экссудата молочно-белого, затем желтовато-янтарного цвета (рисунок 1, в, г). Пораженные

цветки становятся водянистыми на вид, затем темнеют и увядают. Засохшие цветки яблони приобретают темно коричневую окраску, груши – почти черную, которые не опадают в течение сезона. Кора растрескивается, в сухую погоду подсыхает и четко отделяется от здоровой ткани. Древесина под корой в местах поражения приобретает желто-оранжевый цвет. На незрелых плодах появляются маслянистые красно-бурые или черно-бурые пятна, за короткое время охватывающие всю поверхность плода. Со временем плоды мумифицируются. Наиболее интенсивно развитие заболевания происходит весной во время цветения и роста побегов и осенью во время вторичного цветения.

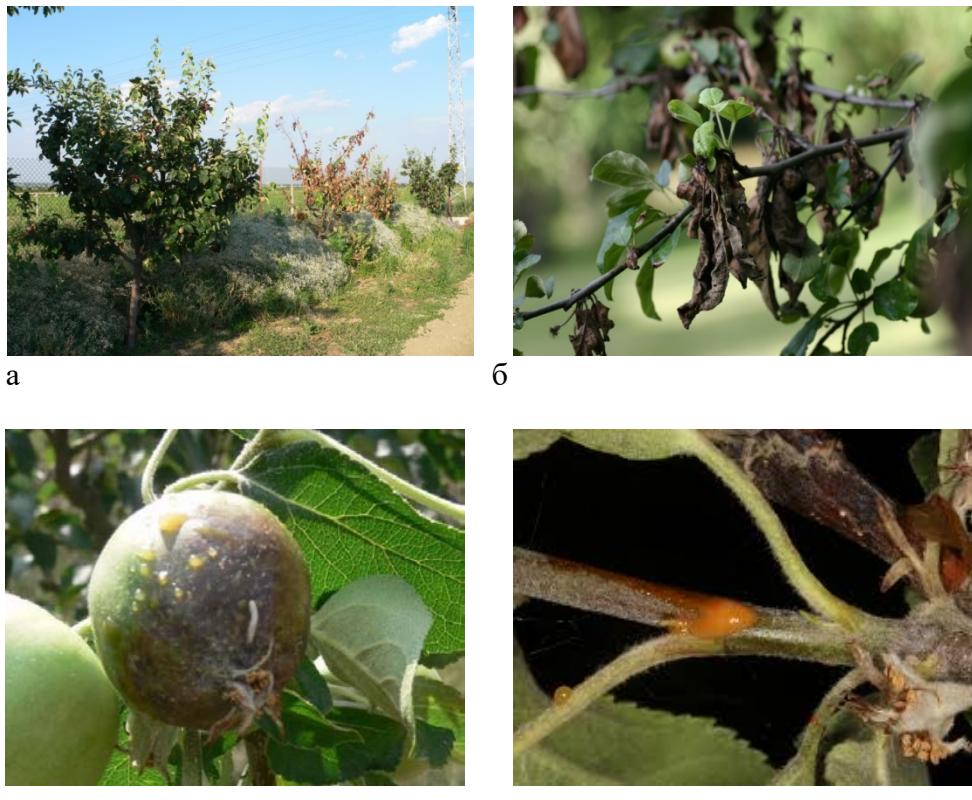


Рисунок 1 - Симптомы поражения бактериальным ожогом

Различают несколько форм болезни: ожог плодов, побегов и цветков. Наиболее опасен ожог цветков, так как через завязь бактерии легко проникают в растения и распространяются по всем его органам. Кроме того, бактерии, возбудители бактериального ожога, могут находиться на поверхности растений в эпифитном состоянии. Именно эпифитные популяции бактерий на цветках в большинстве случаев служат причиной распространения бактериального ожога [10]. Если сильное размножение бактерий весной совпадает с цветением яблони или груши, существует опасность эпифитотии болезни. Крупные эпифитные популяции патогена обычно развиваются на рыльцах пестиков. Переносчиками инокулюма являются муравьи, пчелы, осы, шмели, мухи и тли [11]. Активная инфекция может развиваться в ходе выпадения дождей, обильной росы, смывающей бактерии с рыльца. Бактерии проникают в отверстия нектарников, где находят благоприятную среду для своего развития. На большие расстояния инфекция переносится птицами (преимущественно скворцами и дроздами) или с посадочным и прививочным материалом [12].

Современные сорта яблони и груши имеют различную восприимчивость к поражению бактериальным ожогом. Иммунных сортов на сегодняшний день нет. По данным различных литературных источников и наших наблюдений, очень восприимчивы сорта яблони: Айдаред, Джонатан, Гала, Женева, Апорт, Спартан, Чемпион, Скороплодное, Низкорослое,

Мартовское, Витязь. Средне и мало восприимчивые сорта: Джонаголд, Ампир, Голден Делишес, Ред делишес, Кортланд, Пауларед, Пинова, Жигулевское, Красивое, Вишневое, Мечта, Мелба.

Возбудителем бактериального ожога является бактерия *Erwinia amylovora* - подвижные грамотрицательные палочки размером 1,1–1,6 x 0,6–0,9 мкм с закругленными концами и с большим количеством жгутиков на поверхности. Спор и капсул не образуют. Оптимальная температура роста 26–28°C, минимальная – 6–8°C, погибают при 43–50°C. Весной, с началом сокодвижения, бактерии активизируются и начинают активно размножаться. Этому способствует высокая влажность воздуха и температура выше 18–20°C. В результате размножения бактерий появляется экссудат, выделяющийся на поверхность в виде мелких капель или незаметной тонкой пленки и являющийся источником первичной инфекции цветков, листьев и однолетних побегов.

Меры борьбы с бактериальным ожогом.

Из существующих мер борьбы ни одна не дает полной гарантии оздоровления зараженной плантации. Поэтому основными элементами предотвращения распространения бактериального ожога плодовых являются использование здорового посадочного материала и своевременное выявление очагов инфекции.

Агротехнические мероприятия:

-Выкорчевка и сжигание больных растений в насаждениях, где усыхание деревьев достигает 30% и более. При слабом заражении деревьев допускается удаление отдельных пораженных ветвей кроны с захватом здоровой ткани 20-40 см ниже видимой границы поражения. Обязательным элементом является дезинфекция режущего инструмента 10% раствором медного купороса, 70% метиловым спиртом или 10% раствором гипохлорита Na, дезинфекция срезов 1% раствором медного купороса и обмазка их садовым варом, либо эмульсионной краской.

-Удаление дикорастущих кормовых растений (боярышник и кизильник, произрастающих на расстоянии ближе 500 м от сада).

-Борьба с переносчиками болезни: тля, медяница и др. насекомые.

-Отказ от внесения повышенных доз азотных удобрений, повышение неспецифической устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

-Отказ от летних зеленых операций в зараженных насаждениях.

Химический метод борьбы.

-Для борьбы с бактериальным ожогом плодовых широко применяются медьсодержащие препараты [13]. Однако установлено, что в присутствии меди бактерии *E. amylovora* переходят в жизнеспособное, но некультивируемое состояние. В таком состоянии бактерии жизнеспособны, но не растут на твердой питательной среде. В благоприятных условиях бактерии восстанавливают свою патогенность и опасны для растений-хозяев [14]. Применение медьсодержащих препаратов из-за особенностей поведения бактерий в присутствии меди рекомендуется в начале сезона, так как это помогает уменьшить количество инокулюма в саду [15].

-Начиная с 1950-х годов для борьбы с бактериальным ожогом стали применяться антибиотики, а именно, стрептомицин, окситетрациклин, касумин и гентамицин [16]. Наиболее эффективными из них оказались стрептомицин и касумин [17]. Препараты на основе антибиотиков имеют определенные преимущества в борьбе с фитопатогенными микроорганизмами по сравнению со многими бактерицидами. В частности, антибиотики применяются в очень низких концентрациях, и на единицу обрабатываемой площади их попадает значительно меньше, чем других препаратов. Основной недостаток применения антибиотиков состоит в том, что у бактерий быстро развивается к ним резистентность, а сами антибиотики попадают в организм человека [18]. Через месяц после применения антибиотиков в саду бактериальные популяции не отличаются от таковых бактерий, не обработанных антибиотиками.

Более того, так как стрептомицин продуцируется почвенными актиномицетами, обработка растений этим антибиотиком не меняет микрофлору почв и не приводит к увеличению у бактерий генов устойчивости к данному антибиотику [19]. Чтобы уменьшить частоту возникновения штаммов бактерий, устойчивых к антибиотикам, их используют только при высоком риске поражения бактериальным ожогом.

Эксперты отмечают, что в странах Евросоюза запрещается применение антибиотиков в растениеводстве и садоводстве. Но в связи с тем, что экономическая вредоносность этого карантинного объекта очень велика в сезоны, благоприятные для распространения бактериального ожога, иногда разрешается использование стрептомицина только в конвенциональных садах на очень ограниченной территории и под очень строгим контролем. При точном соблюдении доз, сроков применения и периода ожидания вполне возможно получение продукции, не содержащей ни сам антибиотик, ни продукты его разложения.

Биологический метод борьбы.

В последнее время появились многообещающие данные успешного использования некоторых видов бактерий-антагонистов в борьбе с бактериальным ожогом [20-22]. Виды *Bacillus* имеют долгую историю применения в биоконтроле и стимулировании роста сельскохозяйственных культур [23, 24]. К настоящему времени выявлено несколько видов бактерий, которые потенциально можно использовать против бактериального ожога, в том числе, относящиеся к роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* A506 [25] и EPS62e [26], *P. orientalis* F9 [27], *P. vancoyverensis* L16, *P. chlororaphis* 3M, *P. congelans* 35M, *P. protegens* 59M [28]; роды *Pantoea*: *P. agglomerans* E325 [29], и *P. agglomerans* 10c [30], *P. vagans* C9-1 [31]; роды *Bacillus*: *B. subtilis* QST713 [24], *B. amyloliquefaciens* [32]; *Paenibacillus polymixta* N179 [33]; *Lactobacillus plantarum* [34]; *Serratia* sp. [35].

Среди них несколько были коммерциализированы как биопестициды, такие как BlightBan A506 (*P. fluorescens* A506, США), Bloomtime (*P. agglomerans* E325, США), BlossomBless (*P. agglomerans* P10c, Новая Зеландия), BlightBan C9-1 (*P. vagans* C9-1, США), Serenade (*B. subtilis* QST713, США), Biopro (*B. subtilis* BD170, Швейцария) и BlossomProtect (*Aureobasidium pullans*, Германия).

Однако, проблема заключается в том, что микробы-антагонисты, эффективные *in vitro*, могут недостаточно успешно поддерживать порог популяции в природных условиях из-за сложности выживания в естественной среде обитания. Так, было установлено, что эффективность *Pseudomonas fluorescens* EPS62e зависит от успешной колонизации бактерий на поверхности растений. При изучении динамики численности популяции *P. fluorescens* A506, было установлено, что размер популяции бактерий-антагонистов уменьшался с увеличением возраста цветков. При этом рост популяции *P. fluorescens* A506 сопровождался уменьшением популяции *E. amylovora* и ослаблением болезни [36]. Высокую эффективность в условиях сада показало совместное использование бактерий-антагонистов с серной известью (полисульфид кальция), которая применяется для уменьшения плодовой нагрузки на растения [37].

Таким образом, несмотря на значительные усилия по борьбе с бактериальным ожогом во всем мире, болезнь по-прежнему вызывает большие потери урожая и гибель деревьев. Характерные симптомы бактериального ожога – появление экссудата, образование язв и согнутых побегов, “мраморность” на срезе коры и др., облегчают его диагностику. Однако, данное заболевание можно спутать с другим, похожим на бактериальный ожог, заболеванием – некрозом коры плодовых деревьев, которое вызывается бактерией *Pseudomonas syringae*. Все это вызывает необходимость разработки быстрых и надежных методов диагностики бактериального ожога плодовых. Кроме того, несмотря на то, что эффективность биопестицидов для борьбы с бактериальным ожогом вызывает споры, данная проблема представляет большой интерес не только в Казахстане, но и во всем мире.

Финансирование

Данное исследование финансировалось Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № BR 8574022).

Литература:

- 1 Van der Zvet T., Keil H. *Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants.* Washington D.C., 1979.
- 2 Rosselo M., Pefialver J., Llop P., Gorris M.T., Chartie, R., Garcia F., Monton C., Cambra M., Lopez M.M. Identification of an *Erwinia* sp. from Different *Erwinia amylovora* and Responsible for Necrosis on Pear Blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28: 30-41 (<http://dx.doi.org/10.1080/07060660609507268>).
- 3 Doolotkeldieva T., Bobusheva S. Fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae plants in Kyrgyzstan and biological agents to control this disease. *Advances in Microbiology*, 2016, 6: 831–851 (DOI: 10.4236/aim.2016.611080).
- 4 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaimurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice*, 2013, 3: 44–48.
- 5 McManus P.S., Jones A.L. Role of wind-driven rain, aero-sols, and contaminated budwood in incidence and spatial pattern of fire blight in an apple nursery. *Plant Disease*, 1994, 78: 1059-1066.
- 6 Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R. Pathogenicity and Infection Strategies of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the Art. *Microbiology*, 2013, 159: 823-832 (<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>).
- 7 Schroth M.N., Thomson S.V., Hildebrand D.C., Moller W.J. Epidemiology and Control of Fire Blight. *Annual Review of Phytopathology*, 1974, 12: 389-412 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.002133>).
- 8 Zhao Y., Tian Y., Wang L., Geng G., Zhao W., Hu B., Zhao Y. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(4): 815-820 ([https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62033-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62033-7)).
- 9 Steiner P.W. *Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight.* In: *Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*/ Vanneste J.L. (eds.), CABI, Wallingford, 2000.
- 10 Pusey P.L., Curry E.A. Temperature and pomaceous flower age related to colonization by *Erwinia amylovora* and antagonists. *Phytopathology*, 2004, 94: 901-911 (DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.8.901).
- 11 Braun P.C. Epidemiology of fire blight of floricane fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28(1): P. 95-99 (<https://doi.org/10.1080/07060660609507275>)
- 12 Сметник А.И. Бактериальный ожог плодовых. *Защита и карантин растений*, 2003, 10: 38-39.
- 13 Paulin J.P., Lachaud G. Comparison of the Efficiency of Some Chemicals in Preventing Fire Blight Blossom Infections. *Acta Horticulturae*, 1984, 151: 209-214 (<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1984.151.27>).
- 14 Ordax M. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3482-3488.
- 15 Mikiciński A., Puławska J., Molzhigitova A., Sobiczewski P. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156: 257-272 (DOI: 10.1007/s10658-019-01885-x).
- 16 Fried A., Schell E., Moltmann E., Wensing A. Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. *Acta horticulturae*, 2013, 1056: 55-56 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.5).
- 17 McGhee G.C., Sundin G.W. Kasumin: field results for fire blight management and evaluation of the potential for spontaneous resistance development in *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 2011, 896: 519-525 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.76).
- 18 Duffy B. Environmental monitoring of antibiotic resistance and impact of streptomycin use on orchard bacterial communities. *Acta Horticulturae*, 2011, 896: 483-488 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.71).
- 19 Walsh F. Streptomycin use in apple orchards did not adversely alter the soil bacterial communities. *13th ISHS Int. Fire Blight*, 2013: 68.

- 20 Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of Fire Blight: A Case Study in Microbial Ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 227-248.
(<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.227>).
- 21 Nuclu R., Johnson K.B., Sugar D., Stockwell V.O. Importance of Secondary Spread of Bacterial Antagonists in the Biological Control of *E. amylovora*. *Acta Horticulturae*, 1996, 411: 297.
(<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.411.59>).
- 22 Choi D.H., Choi H.J. Kim Y.J., Lim Y-J, Lee I., Park D.H. Screening of Bacterial Antagonists to Develop an Effective Cocktail against *Erwinia amylovora*. *Research in Plant Disease*, 2022, 28(3): 152-161 (DOI: <https://doi.org/10.5423/RPD.2022.28.3.152>).
- 23 Raafat K.H., Hanan S.A., Rabab A.M. Antibacterial Activity of Antagonistic Bacteria and Plant Extract on *Erwinia amylovora* the Pathogen of Fire Blight Disease in Egypt. *International Journal of Phytopathology*, 2015, 4: 73-79 (DOI: 10.33687/phytopath.004.02.1187).
- 24 Broggini G.A.L., Duffy B., Holliger E., Scherer H.-J., Gessler C., Patocchi A. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro (R)) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 111(2): 93-100 (DOI: 10.1007/s10658-004-1423-x).
- 25 Wilson M., Lindow S.E. Interaction between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology*, 1993, 83: 117-123 (DOI: 10.1094/Phyto-83-117).
- 26 Cabrefiga J., Bonaterra A., Montesinos E. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology*, 2007, 10: 123-132 (DOI: 10.2436/20.1501.01.18).
- 27 Zengerer V., Schmid M., Bieri M., Müller D. C., Remus-Emsermann M. N. P., Ahrens C. H. *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 145 (DOI: 10.3389/fmicb.2018.00145).
- 28 Mikiciński, A., Puławska, J., Molzhigitova, A., Sobczewski, P. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156: 257-272 (DOI: 10.1007/s10658-019-01885-x).
- 29 Pusey P.L. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Disease*, 2002, 86: 639-644
- 30 Vanneste J.L., Cornish D.A., Yu J., Voyle M.D. P10c: a new biological control agent for control of fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees. *Acta Horticulturae*, 2002, 590: 231-235 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.33).
- 31 Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Goesmann A., Ishimaru C.A., Stockwell V.O. Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192: 6486-6487 (DOI: 10.1128/JB.01122-10).
- 32 Shemshura O., Alimzhanova M., Ismailova E., Molzhigitova A., Daugaliyeva S., Sadanov A. Antagonistic activity and mechanism of a novel *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain against fire blight. *Journal of Plant Pathology*, 2020, 102: 825-833 (DOI: 10.1007/s42161-020-00515-4).
- 33 Fallahzadeh-Mamaghani V., Golchin S., Shirzad A., Mohammadi H., Mohamadivand F. Characterization of *Paenibacillus polymixa* N179 as a robust and multifunctional biocontrol agent. *Biological Control*, 2021, 154: 104505 (DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104505).
- 34 Roselló G., Bonaterra A., Francés J., Montesinos L., Badosa E., Montesinos E. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic. *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 137: 621-633 (DOI: 10.1007/s10658-013-0275-7).
- 35 Sharifazizi M., Harighi B., Sadeghi, A. Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 2017, 104: 28-34 (DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.10.007)
- 36 Lindow S.E., Suslow T.V. Temporal dynamics of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees. *Phytopathology*, 2003, 93(6): 727-737 (DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.6.727).
- 37 Johnson K. B., Temple T. N. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Disease*, 2013, 97: 402-409 (DOI: 10.1094/PDIS-07-12-0638-RE).

А.К. САДАНОВ¹, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА^{1*}, Э.Т. ИСМАИЛОВА¹,
 О.Н. ШЕМШУРА¹, Б.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Г.Б. БАЙМАХАНОВА¹, Н.А. БІСЬКО²,
 А.Е. МОЛЖИГИТОВА¹, А.Е. ЕЛУБАЕВА¹, Д.А. ТЛЕУБЕКОВА¹

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

²Н.Г. Холодный атындағы Ботаника институты, Киев, Украина

*e-mail: msyban@mail.ru

ЖЕМІС Дақылдарының бактериялық құйік ауруы

Түйін

Бұл шолу бүкіл әлем бойынша орасан зор экономикалық зиян келтіретін қауіпті карантиндік санатқа жататын жеміс дақылдарының бактериялық құйік ауруына арналған. Өсімдіктердің бұл ауру түрі 1870 жылдан бері 50-ден астам елде тараалды. *Erwinia amylovora* ауруының қоздырығышы Еуразиялық экономикалық одақтың карантиндік объектілерінің бірыңғай тізіміне енгізілген. Бұл ауру питомниктердегі, бау-бақшалардағы жеміс ағаштарының түгелдей немесе қатты зақымдануына, жас ағаштардың жеміс берудің баяулауына, өнімнің төмендеуіне әкеледі.

Кілтті сөздер: бактериялық құйік, жеміс дақылдары, *Erwinia amylovora*, бақылау шаралары

IRSTI: 68.03.07

A.K. SADANOV¹, Z.B. SULEIMENNOVA^{1*}, E.T. ISMAILOVA¹,
 O.N. SHEMSHURA¹, B.B. BAIMAKHANOVA¹, G.B. BAIMAKHANOVA¹,
 N.A. BISKO², A.E. MOLZHIGITOVA¹, A.E. YELUBAYEVA¹, D.A. TLEUBEKOVA¹

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

²N.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev, Ukraine

*e-mail: msyban@mail.ru

FIRE BLIGHT OF FRUIT CROPS

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.02

Abstract

Fire blight of fruit crops is a dangerous quarantine disease that causes huge economic damage around the world. This disease has spread more than 50 countries since its discovery in the 1870s. The causative agent of the disease *Erwinia amylovora* is included in the unified list of quarantine objects of the Eurasian Economic Union. This disease causes serious damage and death of fruit trees in nurseries, orchards, slowing the onset of fruiting in young trees, crop losses.

Keywords: fire blight, fruit crops, *Erwinia amylovora*, control measures

Fire blight of fruit crops is the most dangerous disease of fruit crops. The disease was first described in 1780 in North America. In 1924 this disease appeared in Italy and spread widely throughout Europe. To date, the disease has been identified in 50 countries around the world [1, 2]. Bacterial fire blight has also been identified in the countries of the former Soviet Union, including Russia, Belarus, Ukraine, Moldova, Latvia, Kazakhstan, and Kyrgyzstan [3, 4]. On the territory of Kazakhstan, fire blight was first registered in the early 2000s, and its range is expanding from year to year. Over the past seven years, the area of orchards infected with this disease has grown 40 times. This is due to favorable natural and climatic conditions for the development of the disease (moderate temperature and high air humidity), especially in the south and southeast of Kazakhstan, which are the main areas for growing fruit crops. To date, according to the Agency on Statistics of the Republic of Kazakhstan, the occupied area under plantings of apple and pear is over 36 000 hectares, of which about 3,100 hectares are occupied by the Aport apple variety. The

area infected with bacterial burn is 419.9 hectares, including 342.0 hectares in Almaty region, 72.6 hectares in Zhambyl region and 5.3 hectares in Turkestan region.

Symptoms of the disease begin to appear on the tops of the branches, then move to larger branches, and subsequently spread to the trunk and even the roots of the plant, causing the death of the entire tree [5-7]. Flowers, annual shoots and young ovaries are most susceptible to infection. The first symptoms of the disease begin to appear in the spring during flowering. Small reddish (in apple) and closely brown (in pear) necrosis appear on the leaves between the veins, which spread to the periphery, increasing in size [8].

Young green shoots wither, and their tops are bent in the form of a staff. Affected flowers and leaves do not fall off, remain on the branches for a long time and in this way resemble trees scorched after a fire, hence the name of the disease "fire blight" (Figure 1, a, b). First, the infected tissue becomes shiny and covered with an oily substance, then it becomes necrotic and shrinks [9]. In humid weather, there is an abundant release of bacterial exudate of milky white, then yellowish-amber color (Figure 1, c, d). Affected flowers become watery in appearance, then darken and wither. Dried apple flowers become dark brown, pears almost black, which do not fall off during the season. The bark cracks, dries up in dry weather and is clearly separated from healthy tissue. The wood under the bark in the affected areas acquires a yellow-orange color. On immature fruits, oily reddish-brown or silver-brown spots appear, covering the entire surface of the fruit in a short time. Over time, the fruits mummify. The most intensive development of the disease occurs in spring during flowering and shoot growth and in autumn during secondary flowering.

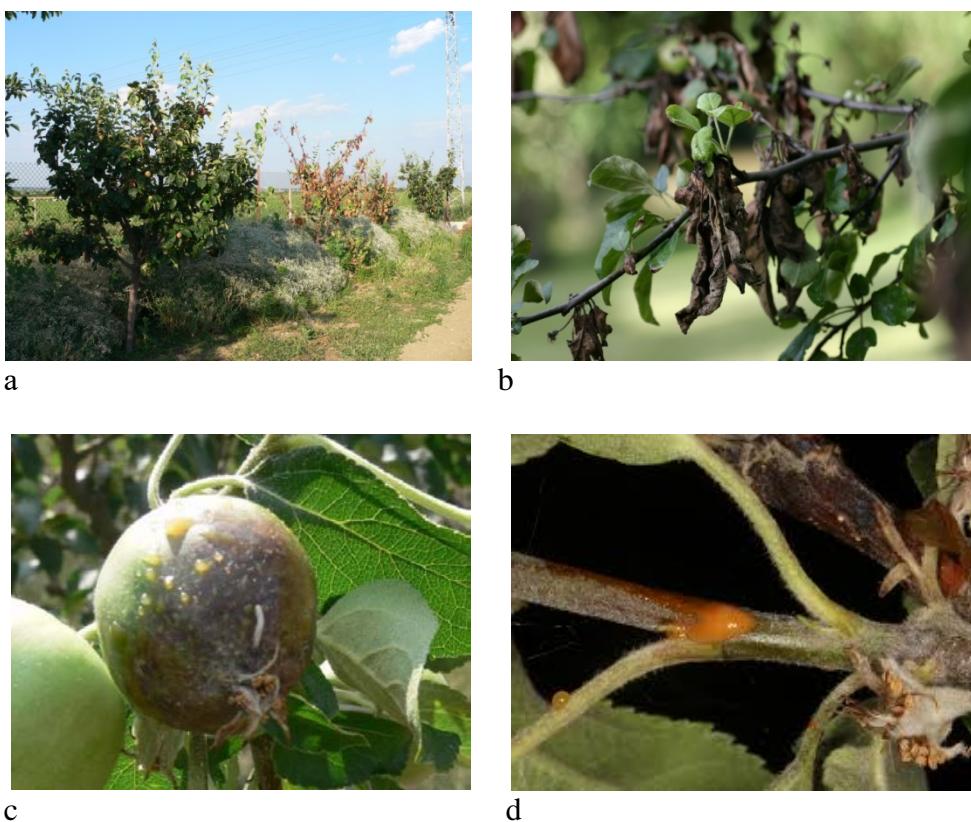


Figure 1 - Fire blight symptoms

There are several forms of the disease: fire blight of fruits, shoots and flowers. The fire blight of flowers is the most dangerous, since bacteria easily penetrate into plants through the ovary and spread to all its organs. In addition, bacteria that cause bacterial fire can be on the surface of plants in an epiphytic state. It is the epiphytic populations of bacteria on flowers that in most cases cause the spread of fire blight [10]. If a strong reproduction of bacteria in the spring coincides with the flowering of an apple or pear tree, there is a danger of an epiphytosis of the disease. Large epiphytic populations of the pathogen usually develop on the stigmas of pistils. Ants, bees, wasps,

bumblebees, flies, and aphids are carriers of the inoculum [11]. Active infection can develop during rainfall, heavy dew, washing bacteria from the stigma. Bacteria penetrate into the openings of nectaries, where they find a favorable environment for their development. Over long distances, the infection is transmitted by birds (mainly starlings and thrushes) or with planting and grafting material [12].

Modern varieties of apple and pear have different susceptibility to fire blight. There are currently no immune varieties. According to various literary sources and our observations, apple tree varieties are very susceptible: Idared, Jonathan, Gala, Geneva, Aport, Spartan, Champion, Skoroplodnoe, Low-growing, Martovskoye, Vityaz. Medium and slightly susceptible varieties: Jonagold, Empire, Golden Delicious, Red Delicious, Cortland, Paulared, Pinova, Zhigulevskoe, Krasivoe, Cherry, Mechta, Melba.

The causative agent of fire blight is *Erwinia amylovora* - gram-negative bacteria of 1.1-1.6 x 0.6-0.9 microns in size with rounded ends and a large number of flagella on the surface. Spores and capsules do not form. The optimum growth temperature is 26-28°C, the minimum is 6-8°C, and they die at 43-50°C. In the spring, with the beginning of sap flow, bacteria become active and begin to multiply actively. This is facilitated by high humidity and temperatures above 18-20°C. As a result of the multiplication of bacteria, an exudate appears, which is released to the surface in the form of small drops or an imperceptible thin film and is the source of the primary infection of flowers, leaves and annual shoots.

Strategies for fire blight control.

Of the existing control measures, none of them fully guarantees the recovery of an infected plantation, therefore, the main elements for preventing the spread of fruit blight are the use of healthy planting material and the timely detection of foci of infection.

Agro technical:

- Uprooting and burning of plants in plantations where the drying of trees reaches 30% or more. With a weak infection of trees, it is allowed to remove individual affected branches of the crown with the capture of healthy tissue 20-40 cm. below the visible border of the lesion. An obligatory element is the disinfection of the cutting tool with 10% copper sulphate solution, 70% methyl alcohol or 10% Na hypochlorite solution, disinfection of sections with 1% copper sulphate solution and coating them with garden pitch or emulsion paint.

- Removal of wild fodder plants (hawthorn and cotoneaster growing at a distance closer than 500m from the garden).

- Combating vectors of the disease: aphids, sucker and other insects.

- Refusal to apply high doses of nitrogen fertilizers, increase the non-specific resistance of plants to adverse environmental factors.

- Abandonment of summer green operations in infested stands.

Chemical control.

- Copper-containing preparations are widely used to combat bacterial fruit burn [13]. However, it was found that in the presence of copper, *E. amylovora* pass into a viable but uncultivated state. In this state, the bacteria are viable, but do not grow on a solid nutrient medium. Under favorable conditions, bacteria restore their pathogenicity and danger to host plants [14]. The use of copper-containing preparations, due to the behavior of bacteria in the presence of copper, is recommended at the beginning of the season, as this helps to reduce the number of inoculum in the garden [15].

- Since the 1950s, antibiotics, such as streptomycin, oxytetracycline, casumin and gentamicin, have been used against fire blight [16]. The most effective were streptomycin and kasumin [17]. Antibiotic-based preparations have certain advantages in the fight against phytopathogenic microorganisms compared to many bactericides. In particular, antibiotics are used in very low concentrations and per unit of cultivated area, they get much less than other drugs. The main disadvantage of using antibiotics is that bacteria quickly develop resistance to them, and the antibiotics themselves enter the human body [18]. One month after the antibiotics were applied, the bacterial populations in the garden did not differ from the bacterial populations not treated with

antibiotics. Moreover, since streptomycin is produced by soil actinomycetes, treatment of plants with this antibiotic does not change the soil microflora and does not lead to an increase in bacteria resistance genes to this antibiotic [19]. However, to reduce the incidence of antibiotic-resistant bacterial strains, they are used only when there is a high risk of fire blight.

Experts note that the use of antibiotics in crop production and horticulture is prohibited in the EU countries. But due to the fact that the economic harmfulness of this quarantine object is very high, in seasons favorable for the spread of fire blight, the use of streptomycin is sometimes allowed only in conventional gardens in a very limited area and under very strict control. With the exact observance of doses, timing of use and the waiting period, it is quite possible to obtain products that do not contain either the antibiotic itself or its degradation products.

Biological control.

Recently, promising data have appeared on the successful use of certain types of bacteria against fire blight [20–22]. *Bacillus* species have a long history of use in biocontrol and crop growth promotion [23, 24]. In addition, several bacteria have been identified to date that can potentially be used against fire blight, including of the genus *Pseudomonas*: *P. fluorescens* A506 [25] and EPS62e [26], *P. orientalis* F9 [27], *P. vancouverensis* L16, *P. chlororaphis* 3M, *P. congelans* 35M, *P. protegens* 59M [28]; *Pantoea*: *P. agglomerans* E325 [29], and *P. agglomerans* 10c [30], *P. vagans* C9-1 [31]; *Bacillus*: *B. subtilis* QST713 [24], *B. amyloliquefaciens* [32]; *Paenibacillus polymixta* N179 [33]; *Lactobacillus plantarum* [34]; *Serratia* sp. [35].

Among them, several have been commercialized as biopesticides such as BlightBan A506 (*P. fluorescens* A506, USA), Bloomtime (*P. agglomerans* E325, USA), BlossomBless (*P. agglomerans* P10c, New Zealand), BlightBan C9-1 (*P. vagans* C9-1, USA), Serenade (*B. subtilis* QST713, USA), Biopro (*B. subtilis* BD170, Switzerland), and BlossomProtect (*Aureobasidium pullans*, Germany).

However, the common problem is that antagonist microbes that are effective *in vitro* may not be successful enough to maintain the population threshold in natural conditions due to the difficulty of surviving in the natural habitat. It has been established that the effectiveness of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e depends on the successful colonization of the bacteria on the plant surface. When studying the population dynamics of *Pseudomonas fluorescens* A506, it was found that the population size of antagonist bacteria decreased with increasing flower age. At the same time, the increase in the population of *Pseudomonas fluorescens* A506 was accompanied by a decrease in the population of *E. amylovora* and weakening of the disease [36]. The combined use of antagonist bacteria with sulfuric lime (calcium polysulfide), which is used to reduce the fruit load on plants, showed high efficiency in garden conditions [37].

As a result, despite significant worldwide efforts to control fire blight, the disease still causes large crop losses and death of trees. The characteristic symptoms of fire blight - the appearance of exudate, the formation of ulcers and bent shoots, "marbling" on a cut of the bark, etc., facilitate its diagnosis. However, this disease can be confused with another disease similar to fire blight, necrosis of the bark of fruit trees, which is caused by the bacterium *Pseudomonas syringae*. All this necessitates the development of fast and reliable methods for diagnosing fruit blight. In addition, despite the fact that the effectiveness of biopesticides in combating fire blight is controversial, this problem is of great interest not only in Kazakhstan, but throughout the world.

Funding

The research was carried out with the financial support of the Scientific Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant № BR 8574022).

References:

- 1 Van der Zvet T., Keil H. *Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants*. Washington D.C., 1979.
- 2 Rossello M., Pefialver J., Llop P., Gorris M.T., Chartie, R., Garcia F., Monton C., Cambra M., Lopez M.M. Identification of an *Erwinia* sp. from Different *Erwinia amylovora* and Responsible for

Necrosis on Pear Blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28: 30-41 (<http://dx.doi.org/10.1080/07060660609507268>).

3 Doolotkeldieva T., Bobusheva S. Fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae plants in Kyrgyzstan and biological agents to control this disease. *Advances in Microbiology*, 2016, 6: 831–851 (DOI: 10.4236/aim.2016.611080).

4 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaimurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice*, 2013, 3: 44–48.

5 McManus P.S., Jones A.L. Role of wind-driven rain, aero-sols, and contaminated budwood in incidence and spatial pattern of fire blight in an apple nursery. *Plant Disease*, 1994, 78: 1059-1066.

6 Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R. Pathogenicity and Infection Strategies of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the Art. *Microbiology*, 2013, 159: 823-832 (<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>).

7 Schroth M.N., Thomson S.V., Hildebrand D.C., Moller W.J. Epidemiology and Control of Fire Blight. *Annual Review of Phytopathology*, 1974, 12: 389-412 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.002133>).

8 Zhao Y., Tian Y., Wang L., Geng G., Zhao W., Hu B., Zhao Y. Fire blight disease, a fast-approaching threat to apple and pear production in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(4): 815-820 ([https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62033-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62033-7)).

9 Steiner P.W. *Integrated orchard and nursery management for the control of fire blight*. In: *Fire Blight: The Disease and its Causative Agent, Erwinia amylovora*/ Vanneste J.L. (eds.), CABI, Wallingford, 2000.

10 Pusey P.L., Curry E.A. Temperature and pomaceous flower age related to colonization by *Erwinia amylovora* and antagonists. *Phytopathology*, 2004, 94: 901-911 (DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.8.901).

11 Braun P.C. Epidemiology of fire blight of floricane fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28(1): P. 95-99 (<https://doi.org/10.1080/07060660609507275>).

12 Smetnik A.I. Bakterialnyi ozhog plodovykh. Zashchita i karantin rastenii, 2003, 10: 38-39.

13 Paulin J.P., Lachaud G. Comparison of the Efficiency of Some Chemicals in Preventing Fire Blight Blossom Infections. *Acta Horticulturae*, 1984, 151: 209-214 (<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1984.151.27>).

14 Ordax M. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3482-3488.

15 Mikiciński A., Puławska J., Molzhigitova A., Sobiczewski P. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156: 257-272 (DOI: 10.1007/s10658-019-01885-x).

16 Fried A., Schell E., Moltmann E., Wensing A. Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. *Acta horticulturae*, 2013, 1056: 55-56 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.5).

17 McGhee G.C., Sundin G.W. Kasumin: field results for fire blight management and evaluation of the potential for spontaneous resistance development in *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 2011, 896: 519-525 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.76).

18 Duffy B. Environmental monitoring of antibiotic resistance and impact of streptomycin use on orchard bacterial communities. *Acta Horticulturae*, 2011, 896: 483-488 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.896.71).

19 Walsh F. Streptomycin use in apple orchards did not adversely alter the soil bacterial communities. *13th ISHS Int. Fire Blight*, 2013: 68.

20 Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of Fire Blight: A Case Study in Microbial Ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 227-248. (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.227>).

21 Nuclø R., Johnson K.B., Sugar D., Stockwell V.O. Importance of Secondary Spread of Bacterial Antagonists in the Biological Control of *E. amylovora*. *Acta Horticulturae*, 1996, 411: 297. (<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.411.59>).

22 Choi D.H., Choi H.J. Kim Y.J., Lim Y-J, Lee I., Park D.H. Screening of Bacterial Antagonists to Develop an Effective Cocktail against *Erwinia amylovora*. *Research in Plant Disease*, 2022, 28(3): 152-161 (DOI: <https://doi.org/10.5423/RPD.2022.28.3.152>).

23 Raafat K.H., Hanan S.A., Rabab A.M. Antibacterial Activity of Antagonistic Bacteria and Plant Extract on *Erwinia amylovora* the Pathogen of Fire Blight Disease in Egypt. *International Journal of Phytopathology*, 2015, 4: 73-79 (DOI: 10.33687/phytopath.004.02.1187).

24 Broggini G.A.L., Duffy B., Holliger E., Scharer H.-J., Gessler C., Patocchi A. Detection of the fire blight biocontrol agent *Bacillus subtilis* BD170 (Biopro (R)) in a Swiss apple orchard. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 111(2): 93-100 (DOI: 10.1007/s10658-004-1423-x).

25 Wilson M., Lindow S.E. Interaction between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology*, 1993, 83: 117-123 (DOI: 10.1094/Phyto-83-117).

26 Cabrefiga J., Bonaterra A., Montesinos E. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology*, 2007, 10: 123-132 (DOI: 10.2436/20.1501.01.18).

27 Zengerer V., Schmid M., Bieri M., Müller D. C., Remus-Emsermann M. N. P., Ahrens C. H. *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 145 (DOI: 10.3389/fmicb.2018.00145).

28 Mikiciński, A., Puławska, J., Molzhigitova, A., Sobczewski, P. Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156: 257-272 (DOI: 10.1007/s10658-019-01885-x).

29 Pusey P.L. Biological control agents for fire blight of apple compared under conditions limiting natural dispersal. *Plant Disease*, 2002, 86: 639-644

30 Vanneste J.L., Cornish D.A., Yu J., Voyle M.D. P10c: a new biological control agent for control of fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees. *Acta Horticulturae*, 2002, 590: 231-235 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.590.33).

31 Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Goesmann A., Ishimaru C.A., Stockwell V.O. Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192: 6486-6487 (DOI: 10.1128/JB.01122-10).

32 Shemshura O., Alimzhanova M., Ismailova E., Molzhigitova A., Daugaliyeva S., Sadanov A. Antagonistic activity and mechanism of a novel *Bacillus amyloliquefaciens* MB40 strain against fire blight. *Journal of Plant Pathology*, 2020, 102: 825-833 (DOI: 10.1007/s42161-020-00515-4).

33 Fallahzadeh-Mamaghani V., Golchin S., Shirzad A., Mohammadi H., Mohamadivand F. Characterization of *Paenibacillus polymixta* N179 as a robust and multifunctional biocontrol agent. *Biological Control*, 2021, 154: 104505 (DOI: 10.1016/j.bioc.2020.104505).

34 Roselló G., Bonaterra A., Francés J., Montesinos L., Badosa E., Montesinos E. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic. *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 137: 621-633 (DOI: 10.1007/s10658-013-0275-7).

35 Sharifazizi M., Harighi B., Sadeghi, A. Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 2017, 104: 28-34 (DOI: 10.1016/j.bioc.2016.10.007)

36 Lindow S.E., Suslow T.V. Temporal dynamics of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees. *Phytopathology*, 2003, 93(6): 727-737 (DOI: 10.1094/PHYTO.2003.93.6.727).

37 Johnson K. B., Temple T. N. Evaluation of strategies for fire blight control in organic pome fruit without antibiotics. *Plant Disease*, 2013, 97: 402-409 (DOI: 10.1094/PDIS-07-12-0638-RE).

FTAMP: 619:630:5767.8

М.Х. НАРМУРАТОВА¹, А. БАЙДУЛЛАЕВА¹, А.Е. МУРАТБЕКОВА¹,
Д.М. МӘЗБАЕВА¹, Ж.Б. НАРМУРАТОВА^{1,2*}

¹әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

²Satbayev University, Алматы, Қазақстан

*e-mail: janarka.90n@mail.ru

КОРОНАВИРУС ҚОЗДЫРҒЫШЫНА ҚАРСЫ ИММУНОМОДУЛИЯЦИЯЛЫҚ АГЕНТ РЕТИНДЕ СҮТ ЛАКТОФЕРРИНІҢ ҚАСИЕТІН СИПАТТАУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.03

Түйін

Бұл мақалада, Қытайдың орталық қаласы Уханьдағы пациенттерде ерекше вирустық пневмонияның пайда болуына әкеліп соқтыратын жаңа коронавирустың пайда болуы SARS-CoV-2-мен (COVID-19) денсаулыққа қауіптілігі туралы жарияланды. Қазіргі COVID-19 пандемиясы барысында, вирусқа қарсы көптеген тағамдық коспалар негізінде аурумен құресуге және алдын алуға назар аударылуда. Лактоферрин (ЛФ) - сүтқоректілердің сүтінде кездесетін табиги тағамдық қоспалардың бірі және темірді байланыстыру қабілеті мен көптеген жасуша рецепторларымен байланысу негізінде иммуномодуляциялық қасиеттерге ие. Лактоферриннің вирусқа қарсы қабілеті SARS-CoV-2-мен (COVID-19 қоздырғышы) тығыз байланысты SARS-CoV және басқа да вирустарға қарсы бағаланды. Сонымен қатар, лактоферрин қабынуға қарсы тиімділікке ие. Лактоферриннің SARS-CoV-2-ге қарсы потенциалына арналған арнайы зерттеу жұмыстарын жүргізу ете қажет, өйткені Лактоферриннің вирусқа қарсы иммунитетке қатысты биологиялық белсенділігіне байланысты SARS-CoV-2 жасушаларын жүқтірудың алдын алады немесе кедергі келтіруі мүмкін. Лактоферриннің SARS-CoV-2-ге қарсы фармакологиялық әсерін бағалау бойынша келесі зерттеулер оның COVID-19-пен құресудегі рөлін көрсетеді деп үміттенеміз.

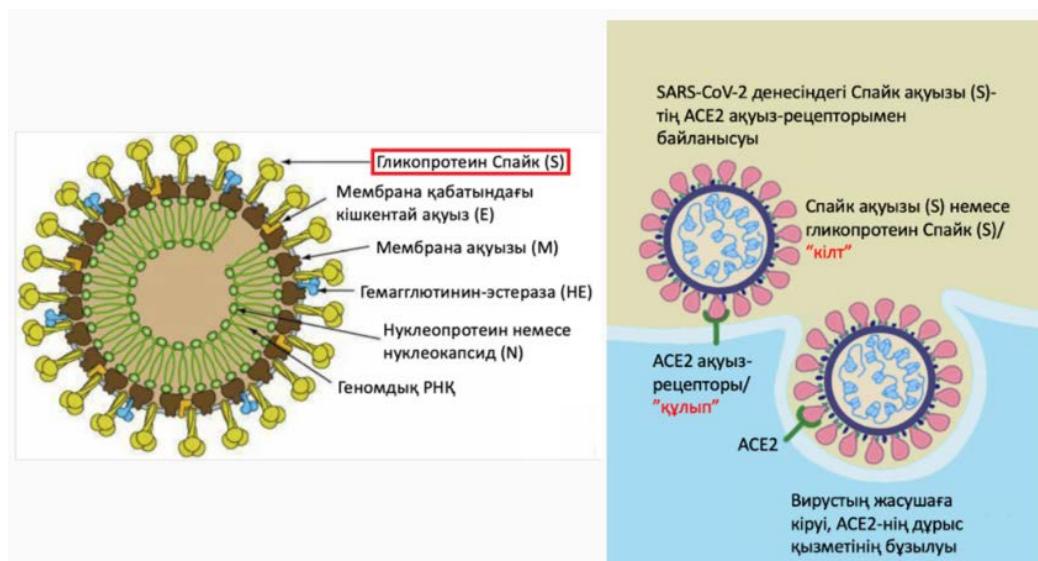
Кілтті сөздер: лактоферрин, SARS-CoV-2, COVID-19, иммуномодуляция.

Вирус – генетикалық материал мен бірнеше ақуыздан құралған дене. Тірі ағзаға енү арқылы көбеюге қабілетті, ауру тудырушы агент. Коронавирус (CoV) – *Virus* патшалығының *Coronaviridae* тұқымдасына жататын, *corona* (тәж) және *viridae* (вирус) сөздерінің бірігінен құралған вирус түрі. CoV - адам, үй жанарлары, құс, жарғанат, тышқанның және басқа да көптеген жабайы жануарлардың тыныс алу жолдарын, асқазан-ішек, бауыр және орталық жүйке жүйелерін зақымдайды [1-3]. Ауыр жедел респираторлық синдром (АЖРС) немесе SARS (SARS - Severe acute respiratory syndrome) жүқпалы және өлімге әкелуі мүмкін респираторлық ауру. SARS - коронавирустың инфекциясының нәтижесі, оны ғалымдар SARS-мен байланысты коронавирус (SARS-CoV) деп атады. 2002-2003 жылдары SARS немесе АЖРС ауруы 5 континенттегі 33 елге таралып, нәтижесінде 8000-нан астам адам инфекция жүктірып, 700 адам қайтыс болған [4-6], ал 2012 жылы Таяу Шығыста респираторлық синдромнан (MERS - Middle East respiratory syndrome) 2428-ден астам адам жүктірып, 838 адам қайтыс болып, қатаң бақылауға алынды. Аталған індептің өршүі секілді, жаңадан пайда болған CoV-та жануарлардан - адамға және адамнан-адамға жылдам таралу мүмкіндігі жағынан қатерлі індеп болғандығын көрсетті [7-8]. 2019 жылы, желтоқсан айының ортасында орталық Қытайда орналасқан Хубэй провинциясына кіретін Ухань қаласының Хуанань жануар мен теңіз өнімдері базарында болған халық тұрғындары белгісіз пневмонияның өршүі бүкіл әлемнің назарын аудартты. Қытайдың ғылыми зертханаларында қатаң реттілік пен этиологиялық зерттеулер жүргізу нәтижесінде, белгісіз пневмонияның қоздырғышы ретінде – жаңа коронавирус (novel coronavirus (nCoV)) анықталды (<http://virological.org/> және <https://www.gisaid.org/>). Осыдан кейін, Қытай ғалымдары коронавирустың жаңа түрін - SARS-CoV-2 деп атады. Оның генетикалық құрылымы ауыр жіті респираторлық синдромды қоздыратын SARS-CoV

вирусына 70% ұқсайтыны анықталған. 2020 жылдың 12 қаңтарында Дүниежүзілік денсаулық сақтау үйімінде үақытша жаңа вирусты 2019 жылдың жаңа коронавирусы (2019 - nCoV) деп атады [9]. SARS-CoV-2-нің негізгі таралу жолы заттардың сыртқы беті арқылы таралуы мүмкін, атап айтқанда, ауруды жүқтірған адам жөтелгенде немесе ауруды жүқтірған адамды ұстаган дene мүшенизбен бетінізді, көздерінізді, мұрныңызды үқалаған сәтте жүзеге асады [10]. Алайда, вирустың ол жерлерде қанша үақыт өмір сүретіндігі белгісіз. Осылайша, вирус ағзаға еніп, көбейеді және басқа мүшелерге таралады. Негізгі зақымдаушы нысандары: ішек, қөкбауыр және ең қауіпті әсер ететін мүшесі өкпе. Вирусты жүқтірған адамдарда құрғақ жөтел, температураның жоғарылауы, ентігу, екі жақты пневмония және басқа да белгілер, соның ішінде, тамақ ауруы, диарея мен құсудың жеңіл және ауыр клиникалық көріністері байқалады [10]. Ауырган науқастар инфекция жүқтірған адамдармен және тыныс алу тамшыларымен тығыз байланыста болуы мүмкін [11]. Вируска қарсы көптеген емдеу әдістері ұсынылған. Алайда, адамдарға сынақ жүргізу кезеңі бірнеше айға немесе бір жылға созылуы мүмкін [12]. Пандемиямен құресудің қазіргі әдісі - оқшаулану, жеке гигиена шаралары және дұрыс тамақтану.

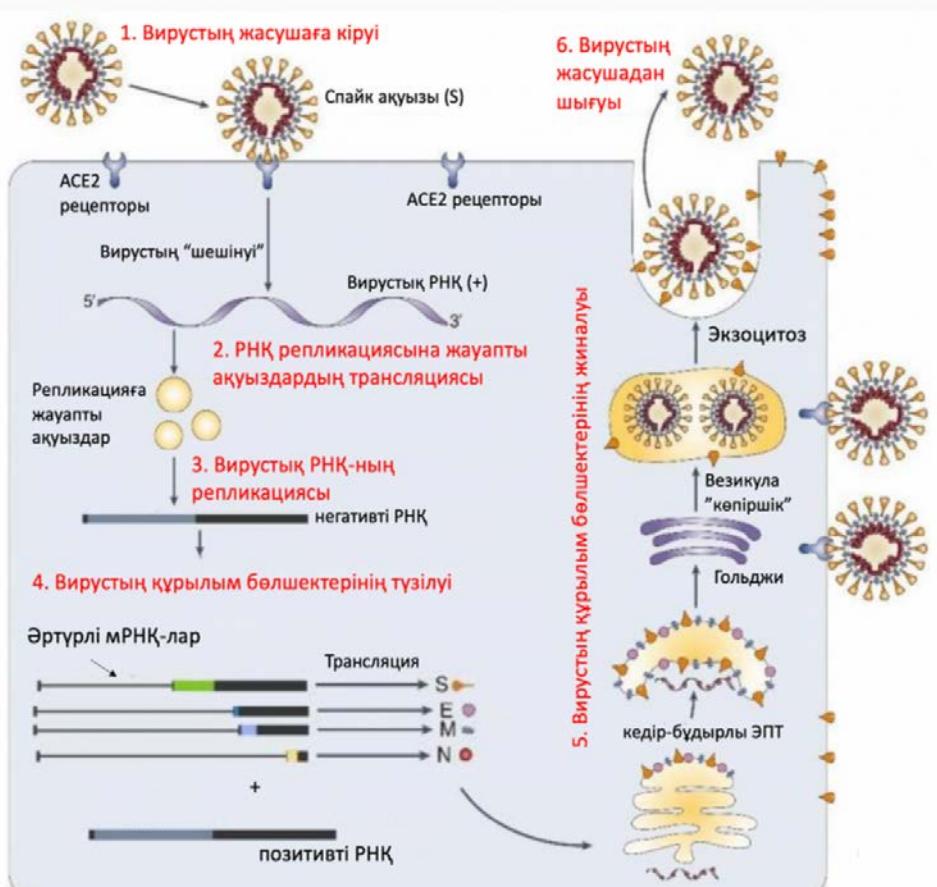
CoV-тың жаңа түрлерінің пайда болуы мен өршуі, денсаулыққа қауіпті жаһандық қатерлі індеп болып табылатындығын көрсетті. Болашақта, климат пен экологияның өзгеруіне және адамның жануарлармен қарым-қатынасының күшеюіне байланысты қауіпті індеп жаңадан өршуі мүмкін. Осылайша, жедел терапия мен CoV - ға қарсы вакциналар жасау қажеттілігі туындалады. Әлемдік пандемияға айналдырған коронавирустың жаңа індептің алдын алу және одан қорғануға мақалада келтірілген мәліметтер өз септігін тигізеді деп үміттеміз.

Коронавирустың жасушасынан жолы. Коронавирустың адам жасушасына енуі келесідей этаптардан тұрады. 1. Адамның мұрын, ауыз немесе көз мүшелерімен көмегімен ағзаға енген вирус ангиотензин конвертеуші фермент 2 (ACE2) ақызы – рецепторына қарай бағытталады (сурет 1). ACE2 - металлопептидаза, SARS-CoV-2 үшін маңызды функционалды рецепторлардың бірі. Ангиотензин конвертеуші фермент 2 рецепторы кейбір мүшелердің құрамына кіретін жасушалардың бетінде орналасады, атап айтқанда, ауыз қуысы мен мұрынның шырышты қабаты, өкпе, асқазан, аш ішек, тоқ ішек, лимфа түйіндері, айырша без, сүйек кемігі, бауыр, көк бауыр, бүйрек және мидың құрамында болатын жасушаларда кездеседі. ACE2 рецепторы өкпе альвеолының эпителий жасушаларының бетінде өте көп болады [13].



Сурет 1 - Коронавирус жасушасы мен оның ACE2 рецепторымен байланысуы бейнеленген [27]

Бірінші суретте бейнеленгендей, коронавирус вирусы ангиотензин конвертереуші фермент 2 рецепторын жасуша бетінен танығаннан кейін, аталған receptor мен Спайк ақуызы (S) «кілт» пен «құлыш» секілді бір-бірімен берік байланысады. Кристаллографиялық зерттеулерде көрсетілгендей, құрамында S1 сегмент (318-510 амин қышқыл қалдықтары) ангиотензин конвертереуші фермент 2 рецепторы үшін маңызды receptorлармен байланысатын аймақ [13-15]. Берік байланыс әсерінен қан қысымын реттеуге қатысатын ACE2 рецепторының қызметі бұзылады. Нәтижесінде, ангиотензин конвертереуші фермент 2 рецепторы көмегімен SARS-CoV-2 вирусы адам ағзасының жасушасына енеді [16]. Жасуша ішіне енгеннен кейін, коронавирус вирусы сыртқы қоршап тұрған барлық құрылымдық ақуыз қабатынан босайды [15]. Жоғарыда көлтірілген реттілікпен, SARS-CoV-2 өзі немесе тек геномдық РНҚ цитоплазмаға енеді. Ал, SARS-CoV вирусының РНҚ геномы ұзындығы шамамен 30000 нуклеотидті құрайды [17]. Вирустың жасуға енуінің келесі сатысында, цитоплазмаға енген вирус, РНҚ ақуызына жауапты ақуыздардың трансляциясы кезеңі басталады. Цитоплазмаға енген геномдық РНҚ репликация процесі негізінде екі еселену процесі жүреді. РНҚ репликациясын жүзеге асырмас бұрын SARS-CoV-2-қа РНҚ репликациясын жүзеге асыратын маңызды ақуыздар қажет. Аталған ақуыздарды вирустық РНҚ-ны материал көзі ретінде пайдаланып түзілуі трансляция деп аталады. Осы процесті жүзеге асыру процесінде SARS-CoV-2 вирусы қожайын жасушашы паразиттік жолмен пайдаланады (сурет 2).



Сурет 2 - SARS-CoV-2 вирусының жасушаға ену жолының схемасы [27]

Үшінші сатысы, вирустың РНҚ репликациясы жүреді. Ол, екінші кезектегі РНҚ репликациясына жауапты ақуыздардың түзілгенінен кейін вирустық РНҚ-да репликация процесі жүмыс істейді. Аталған, SARS-CoV-2 - позитивті РНҚ-лы вирустар қатарына жатады. Репликация кезеңі аяқталғаннан соң, позитивті РНҚ-дан негативті РНҚ түзіледі.

Осыдан кейін, төртінші сатысы вирустың құрылым бөлшектерінің түзілуі басталады. SARS-CoV-2-нің негативті РНҚ-дан жаңа вирустардың құрылым бөлшектері түзіле бастайды. Негативті РНҚ-ны материал көзі ретінде пайдаланып, бірнеше мРНҚ-лар түзіледі. Нәтижесінде, мРНҚ-дан вирустың гликопротеин S ақуызы, мембрана ақуызы (M), кішкентай ақуыз (E), нуклеокапсид (N) секілді құрылымдық ақуыздар түзіледі. Бесінші сатысында, құрылымдық ақуыздар ЭПТ-дың ішінде құрылғаннан кейін, ақуыздар мен РНҚ Гольджи аппаратына өтеді. Гольджи аппаратының ішінде құрылымдық ақуыздар мен позитивті РНҚ толық вирус ретінде бірігіп, визикула «көпіршіктердің» ішіне орналасады. Алтыншы сатысында, визикуланың ішіндегі толығымен жинақталған вирус экзоцитоз процесі арқылы жасушадан сыртқа шыға бастайды. Толық дамып жетілген вирус, басқа жасушаларға шабуыл жасайды [19-28].

Ағзаның вирусқа төзімділігі дұрыс тамақтану жүйесімен тығыз байланысты. Табиги биологиялық белсенді заттармен байытылған тағам өнімдері ағзага вирустың инфекциялардың қаупін азайтуы мүмкін [29]. Иммунитетті жақсартуда тағам құрамындағы мұндай компоненттер В және Т жасушаларын белсенділігін арттырады және олардың көбеюіне, тұа біткен және адаптивті иммундық жауаптың индукциясы мен модуляциясына қатысады [30-31]. Келтірілген мәліметтер негізінде, онтайлы тамақтану иммунитеттің COVID-19-ға қарсы тұрудың бірден-бір тұрақты әдісі.

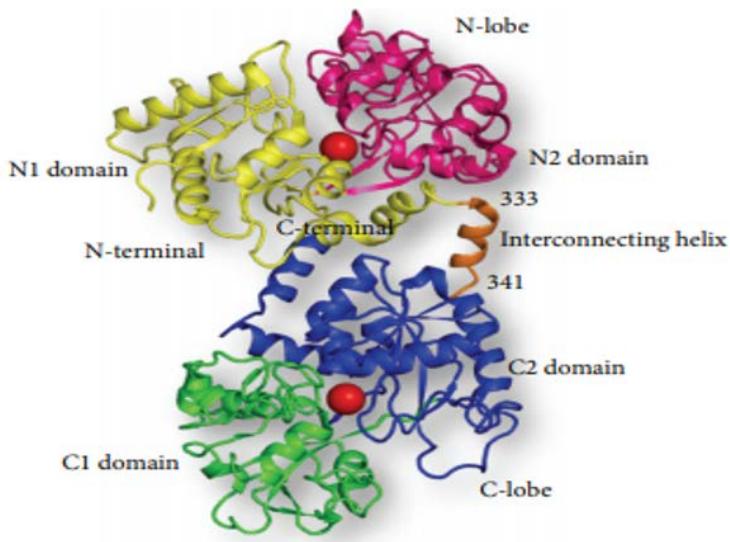
Тағам өнімдерінің ішінде сүт және сүт өнімдері құрамындағы бағалы ақуыздарымен иммундық жүйеге пайдалы [32]. Эпидемиологиялық зерттеулер сиыр, бие және түйе сүтін тұрақты тұтыну адамдарда бактериялық және вирустың инфекциялардың төмен таралуымен сипатталған [33-34]. Сүттегі маңызды компоненттерінің бірі – лактоферрин (ЛФ), ол трансферриндер тұқымдасына кіретін көп функциялық ақуыз.

Лактоферрин ақуызының иммунопротекторлық және қабынуға қарсы қасиеттері SARS-CoV-2 тәрізді респираторлық вирустардан қорғауды қамтамасыз ететіндігі бірқатар ғылыми мақалаларда көрсетілген [9;15;35]. ЛФ-нің COVID-19-ге қарсы иммундық қорғаудағы потенциалын зерттеу үшін оның биологиясын, құрылымын, онымен байланысатын мембранның рецепторларын, иммуномодулярлық және вирусқа қарсы механизмдерін, сонымен қатар көздерін білу қажет. Ұсынылған мақалада лактоферриннің вирустарға қарсы профилактикалық, терапиялық, иммунопротекторлық және механизмін қарастырып, лактоферрин ақуызының COVID-19 емдеудің қосымша әдісі ретінде рөлі талқыланған.

Лактоферриннің құрылымы және физика-химиялық қасиеті. ЛФ ақуызы - трансферриндер (ТФ) тобына жататын гемсіз темір байланыстырығыш гликопротеин. Лактоферрин алғаш рет 1939 жылы сиыр сүтінен (сурет 3), ал 1960 жылы ана сүтінен бөлініп алынды. ЛФ-тің аминқышқылдық тізбегі жануарлардың 10 түрінен (адам, сиыр, тышқан, жылқы, доңыз, ешкі, қой, буйвол және түйе) анықталған [36-37]. ЛФ ақуызы молекуласының ұзындығы шамамен ~700 аминқышқылы қалдығынан түзілген бір полипептидтік тізбектен тұрады. Молекулалық салмағы ~ 76-80 кДа. Адам мен тышқан ЛФ ақуызы бойынша бірінші реттік құрылымының ұқсастығы 70%, адам мен сиырда – 69%, сиыр мен тышқанда - 63% [38]. Адам ЛФ ақуызы бірінші реттік құрылымы адам сарысу ТФ жоғары деңгейде ұқсастыққа ие (~ 59 %). Альтернативті промоторлар - P1 және P2 - әсерінен ЛФ генінің транскрипциясы екі өнімнің түзілуіне әкеледі: мРНҚ ЛФ және дельта-ЛФ (Δ - ЛФ) [39]. Δ -ЛФ-де N-соңғы сигналдық тізбегі болмау себебінен оның ешқандай қызметі жоқ [40]. Адам ЛФ изоэлектрлік нүктесі әдебиет көздерінде 8.0-8.5 [41]; 8.7 және 9.7 аралығында ауытқиды [42].

ЛФ ақуызының полипептидтік тізбегі глобулярлы екі гомологты С және N бөліктерден құралған (сурет 3). Екі бөліктегі амин қышқылдық құрамының ұқсастығы 37% - ға жуық. N бөлігі, полипептидтік тізбектің N-соңын (1-332 амин қышқыл қалдықтары), С бөлігі С-соңын (345-691 амин қышқыл) құрайды. Олар қысқа альфа-спиральмен (333-344 амин қышқылы) байланысқан, осы байланыс молекулаға қосымша серпімділік қасиет береді [37]. Әр бір бөлік эллипсоид пішінді, көлемдерінің реттілігі $55\times35\times35$ Å. Ақуыз

молекуласы симметриялы емес, себебі бөліктер бір-біріне $\sim 150^\circ$ бұрышта бұрылыш жасаған және 25 Å ығысқан. Әрбір бөлік өз кезегінде екінші реттік құрылымы өте үқсас екі доменнен тұрады [37; 43]. Молекула $\approx 43\%$ α -спиральдан және $\approx 27\%$ β -қатпардан тұрады. Ақуыз құрылымында 16 дисульфидтік байланыс бар, оның 6 жұбы екі бөлікте тең, ал қалған 4 жұбы С-бөлігінде орналасқан. Iрі қара лактоферрин ақуыз молекуласының жалпы схемесі үшінші суретте келтірілген.



Сурет 3 - Iрі қара лактоферрин ақуызы молекуласының схемасы

N1 және N2 домендері сәйкесінше сары және қызыл, ал C1 және C2 домендері сәйкесінше жасыл және көк түстермен, ал бөліктер (лоб) арасындағы өзара байланысты спираль қызыл сары түсті, екі темір атомы қызыл шар түрінде көрсетілген [44]

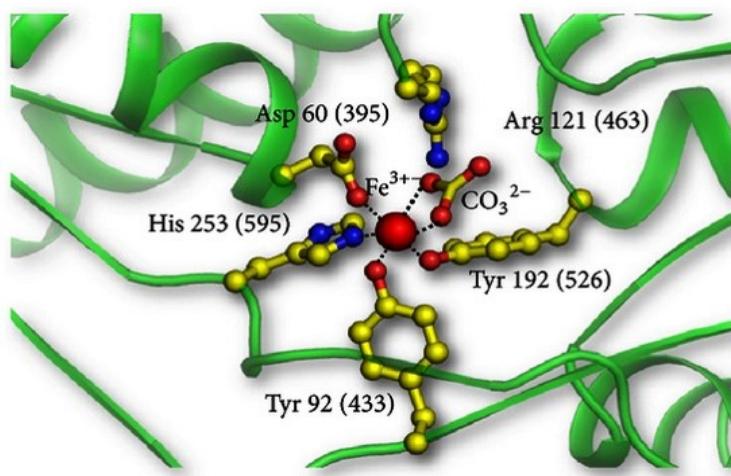
ЛФ екі түрлі формада кездеседі: apo (темірмен қанықпаған ақуыз) және холо (белсенді орталығында Fe^{3+} бар) болады. ЛФ ақуыз молекуласы Fe^{3+} екі ионымен кері байланысуға қабілетті. Әрбір бөліктегі домендер (N1, N2 және C1, C2) аралығындағы теренірек аймақта темір - байланыстыруыш сайttар бар, олардың көлемі $\sim 42 \text{ \AA}$ құрайды. Темірдің әрбір атомы төрт ақуыздық лигандпен үйлестірілген: Туг-92 және Туг-192 фенолят-иондардағы (сәйкесінше Туг - 435 және Туг - 528 С-соңында) екі оттегі атомдарымен, His - 253 (His - 597) имидазолдағы №2 азот атомымен және Asp-60 (Asp-395) карбоксильдегі оттегімен. Темірдің әрбір атомының октаэдрлік ортасы бар, дегенмен де, төрт ақуыз лигандты алты позицияның тек төртеуін ғана алып жатады. Зерттеулерге сәйкес қалған екі позицияда CO_3^{2-} немесе HCO_3^- аниондары орналасады [37; 43].

ЛФ-тің темірмен байланысу схемасы көрсетілген (сурет 4). Темір атомы қызыл шар түрінде бейнеленген, ал ЛФ-тің өзара әрекеттесетін аминқышқылдарының қалдықтары сары түсті. Қалдық сандар N-соңына сәйкес келеді, ал С-соңының тиісті аминқышқылы қалдықтары жақшада орналасқан [44].

Анион пептидтің оң зарядталған N-соңымен және Arg-121 радикальмен байланысады. Мутагенез бойынша жасалған тәжірибелерде, белсенді орталықтағы кез келген 4 қалдығының алмастырылуы темірді байланыстыру қабілетінің бірден нашарлауына алып келетіндігі дәлелденген. Arg-121 қалдық бойынша мутация да дәл осындай әсерге алып келеді [38; 43].

ЛФ ақуызына темір берік әрі қайтымсыз ($K_d \sim 10^{-20} \text{ M}^{-1}$) байланысады. ЛФ ақуызы темірді тіпті бәсекелес лиганд (мысалы, цитрат) және pH мәні 3,0 болған жағдайда да байланыстыруға қабілетті, ал ТФ тобының басқа ақуыздары pH~5.5 болғанда темірді босатады [37]. ЛФ мен ТФ әртүрлі қасиеттері ЛФ-ғы екі бөліктің (лобтың) үйлесімді байланысымен анықталады [38]. ЛФ С-бөлігіне темірдің байланысы Н-бөліктегі оның

(темірдің ақуызға) байланысын анағұрлым түрақтандырады. Мұнда N-бөлікпен қатынасатын С-соңындағы альфа-спираль маңызды қызмет атқарады. ТФ-де осы құбылыстың болмауы ЛФ-гі екі бөлікті байланыстырытын пептид құрылымындағы ерекшелікпен түсіндіріледі. Барлық сипатталған ЛФ осы пептид альфа-спираль түзеді, ал ТФ-да оның әлсіз, түзу, ретсіз құрылымы болады. Альфа-спиральдің мықтылығы екі бөліктің тығыз байланысуын қамтамасыз етіп, N-бөлікке темірдің байланысуын түрақтандырады. Нәтижесінде, темірдің босап шығуына (ЛФ-дан) эсер етіп pH мәнін төменгі шекке қарай ығыстырады. ТФ молекуласында лизиннің – Lys-206 және Lys-296 – қалдықтарының болуы ЛФ және ТФ қызметтеріндегі айырмашылығына себепші болуы мүмкін. Осы екі қалдық ерекше сутектік байланыс түзеді. Адам ЛФ ақуызы Arg-210 және Lys-301 осы жұп қалдықтармен алмасқан. Дегенмен, сиыр, буйволъ, жылқы және түйе ЛФ ақуызында ТФ-ғы позицияға ұқсас лизиннің екі қалдығы болады – Lys-2010 және Lys-301. Алайда, осы екі қалдық арасында байланыс түзілмейді, сәйкесінше ақуыздардан ерекшелік байқалмайды [37-38].



Сурет 4 - Лактоферриннің темірді байланыстыру схемасы [26]

Темірдің ақуызбен байланысуы және босап шығуы ЛФ ақуызында құрылымдық өзгерістерге алып келеді [37]. ЛФ ақуызы ашық құрылым жағдайында темірмен байланысады: ең алдымен анионмен байланысып, нәтижесінде лигандрардың ығысуына алып келеді. Сосын, темір ЛФ ақуызы молекуласымен толық байланысып, ары қарай ЛФ өте ықшам құрылымдық пішінге, яғни жабық құрылымдық пішінге ауысады. ЛФ ақуызының апо-формасы металлдардың басқа да иондарымен байланыса алады, әдетте жоғары оң зарядты иондар (Cr^{3+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , лантаноидты иондары) [37-38]. Аталған металл иондары ЛФ ақуызына Fe^{3+} байланысатын амин қышқылдар арқылы байланысады. Сонымен қатар, ЛФ ақуызының пептидті тізбектің участекері көмегімен 70 дейін Fe^{3+} иондарын байланыстыра алатындығы зерттеудерде көрсетілген [45]. Нәтижесінде, ЛФ ақуызы 15-16 молекулаларынан тұратын зат түзіледі. Осы зат нативті ақуызға қарағанда түрақтылығы өте жоғары. Түрақтылықтың жоғарлауы осы заттағы әртүрлі ЛФ ақуызы молекулаларының құрамында болатын Fe^{3+} және HCO^{-3} иондарының арасындағы электростатикалық байланысқа негізделген [37].

ЛФ ақуызы глобулярлы гликопротеин [39]. Көмірсу фрагменті ақуызбен аспарагиннің (Asn-137 және Asn-490) амидті азоты арқылы гликозидтік байланыс түзеді. ЛФ құрамындағы гликозидтік байланыстардың саны және орналасуы жануарлардың түрлеріне байланысты ауытқиды [37; 39]. ЛФ-нің көптеген функциялары оның әркелкі таралған беттік зарядымен анықталады. Оң зарядталған үш аумақты бөліп көрсетуге болады: N-

соңында (1-5 қалдықтар), бірінші альфа-спирадельде (12-31 қалдықтары) және екі бөлік аралығында. Адам ЛФ-нің N-соңындағы GRRRR сигналдық тізбегі осы ақуыздың ядроға енуін қамтамасыз етеді. Осылайша, ол транскрипциялық фактор ретінде қызмет атқарады. Жоғарыда келтірілген сигналдық тізбек тек адам ЛФ тән, басқа жануарларда болмайды [37].

Лактоферриннің кездесетін қоздері. ЛФ ақуызы әртүрлі сұтқоректілердің шырышты әпителій жасушаларынан бөлінеді [46-50]. ЛФ ақуызы барлық экзокринді бездер сөлдерінен: көз жасында (2 мг/мл [41; 46-50] немесе 0,4 мг/мл), сілекей (0,013 мг/мл), назальді және бронх, өт сөлдерінен (0,0042 мг/мл), панкреатит сөлінен, ұрық сұйықтығынан (0,518 мг/мл), зэр (0,00005 мг/мл), тер (0,0025 мг/мл) анықталған. ЛФ өте көп мөлшерде сұтте (1,28 мг/мл) және уызда (7 мг/мл немесе 3,2 мг/мл) кездеседі [37; 51]. Сұттегі казеиннен кейінгі ең кең таралған ақуыз. Сиыр сұтінде ЛФ концентрациясы лактация кезеңіне, сиыр тұқымына байланысты 31,78 - 485,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ -ге аралығында өзгереді [51], ал оның уыздағы концентрациясы 1-5 mg/mL. Сонымен қатар, түйе сұтіндегі лактоферрин концентрациясы 20-2100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [52-53] құрайды [30]. Зерттеулер көрсеткендегі, түйе сұтінің лактоферрині қалыпты сұтте 0,02-ден 7,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ -ге дейін өзгереді, бірақ лактоферриннің максималды мөлшері төлдегеннен кейін шамамен 48 сағатта 2,3 g.L⁻¹ мөлшерді құрайды [54]. Ирі қара мал мен адам ЛФ-нің биологиялық белсенділігі ұқсас болғандықтан, лактоферрин ақуызының қолжетімді көзі ретінде жануарлар сұтін пайдалануға мүмкіндік береді. Сұт бездерінде ЛФ ақуызының бөлінуін (транскрипция және трансляция) пролактин бақылайды, ал жыныс жолдарында ЛФ ақуызы экспрессиясын стероидты гормон – эстроген индициурлайді. Қан түзілу жүйесінде ЛФ миелоциттердің пісіп-жетілу сатысында дамып жатқан нейтрофилдерде экспрессияланады (синтезделеді) [37]. Нейтрофилдердің екіншілік түйіршіктегінде қорға жинақталады. Олардағы ақуыздың мөлшері нейтрофилдердің $15 \text{ мкг}/10^6$ құрайды [40]. Сонымен қатар, ЛФ қаннан (0,001 мг/мл) және амион сұйықтығынан (0,006 мг/мл) анықталған. Қандағы қалыпты мөлшері шамамен 1 мкг/мл, дегенмен қабыну кезінде оның мөлшері 200 мкг/мл дейін жетуі мүмкін [37].

Лактоферриннің үш түрлі изоформасы белгілі, оларға альфа ЛФ (LF- α), бета ЛФ (LF- β) және гамма ЛФ (LF-g) жатады. LF- α темірді байланыстырады, бірақ қалған екі изоформалар LF- β және LF-g темірмен байланыспайды [55-57].

Лактоферриннің иммуномодуляциялық әсері. ЛФ ақуызының мембранның рецепторлармен байланысу механизмі, оның биологиялық белсенділігін көрсетеді. ЛФ келесі рецепторлармен байланысады: TLR2, TLR4 [58], CD14 [59], цитокинді рецепторлар [60] және Intelectin-1 [61]. Бұл рецепторлардың барлығы жасушалар мен тіндердің көптеген түрлерінде, соның ішінде лимфоциттерде және ішек әпителій жасушаларында кездесетіндігі туралы айтылған [62]. ЛФ ақуызының рецепторлармен байланысу қабілеті оның вирусқа қарсы иммунитетті жоғарылату мен ағзаның қорғаныс механизмі үшін маңызды. ЛФ ақуызы өзінің иммуномодуляциялық белсенділігін инфекциялық молекулалармен бәсекеге тұсу арқылы жүзеге асырады, осылайша бөлшектердің қосылуын тежейді [63]. ЛФ ақуызының ерекшелігі, гепаран сульфаты протеогликандарымен (HSPGs) байланысады, оны SARS-CoV және адамның коронавирустық NL63 жасушаға бекіту және енгізу рецепторы [6; 64]. SARS-CoV-2 өзінің функционалды рецепторы ретінде ACE2-ді қолданады, бірақ гепаран-сульфатты протеогликандармен (HSPG) байланысуы мүмкін, өйткені SARS-CoV екі рецепторды да байланыстыратындығы анықталған, алайда SARS-CoV-2 үшін HSPG-ді қолдану туралы зерттеулер толық дәлелденбegen. Эпителій жасушалары зиянды заттардың енуіне кедергі келтіретін алғашқы физикалық тосқауыл болып саналады және тұа пайда болған иммунитетте маңызды рөл атқарады [65].

ЛФ ақуызы иммундық жүйеде және инфекция мен қабынудың қорғаныс жүйесінде маңызды рөл атқарады [61]. Оның кейбір иммуномодуляциялық әсерлері липополисахаридті (LPS) кешендерге негізделген. ЛФ ақуызы вируспен байланысқан LPS-пен байланысады, осылайша вирустың жасушаға енуіне жол бермейді, бірақ вирус жасушаға енген болса, ол гранулоциттер мен макрофагтар сияқты киллер жасушаларды

ынталандыру арқылы вирустың көбеюін тежейді [65]. ЛФ ақуызы цитокиндер/химокиндер мен пероксидтер өндірісін реттеуге [66-67], иммундық жасушаларды, атап айтқанда макрофагтарды, нейтрофилдерді, базофилдерді, эозинофилдерді, мастоциттерді және дендриттік жасушаларды белсендердіге және пролиферациялауға қатысады [35]. Жасушалардың фагоциттік қабілеті ЛФ ақуызының белгілі бір байланыстыруыш сайттарды тану арқылы модуляцияланады [68].

Ядрога жеткізілген ЛФ ақуызы ДНҚ-мен байланысады және әр түрлі сигнал беру жолдарын белсендерді [41; 69]. ЛФ-нің ісік некрозы альфа - факторы және интерлейкин (IL) -1, IL-2 және IL-6 сияқты қабынуға қарсы цитокиндерді тежеу белсендердің інтерферонгамма арқылы анықталған. Сонымен қатар, жасушалық деңгейде ЛФ қанның полиморфты ядролық жасушаларын қабылдауды күштейтеді және миелопоэтикалық процесті ынталандырады [41]. Сондай-ақ, созылмалы ауруларда ЛФ перифериялық қандағы Th1 цитокин профилін жоғарылатады [70].

ЛФ-нің деградациясы нәтижесінде алынған лактоферрицин пептиді, қабыну процесінің басталуын шектейді, IL-10 өндірісін күштейтеді, осылайша Th2 (қабынуға қарсы) тәрізді белсендердің ынталандырады. ЛФ интерференциясы фибробласт генінің экспрессиясы арқылы пайда болады, ақуыз өндірісін модуляциялайды және жасушадан тыс матриданы өзгертеді, осылайша иммундық жасушалардың қозғалғыштығын арттырады [71].

Лактоферрин ақуызының вирусқа қарсы әсері. ЛФ ақуызы вирусқа қарсы қасиеті адам мен жануарларды инфекциялайтын РНҚ және ДНҚ-вирустардың көпшілігіне кедергі келтіреді. ЛФ ақуызы вирустарға қарсы әсерінің екі түрі белгілі. Біріншіден, қожайын жасушамен вирустың байланысу сатысын тежеуі мүмкін, мысалы герпес, В гепатиті, адамның цитомегаловирусы, адено-, рота- және полиовирустар. Екіншіден, зақымдалған жасушаларда вирустың репликация процесін тежейді (С және G гепатиті, ЖИТС). Зақымдалу процесінің алғашқы сатысында ақуыз вирусқа қарсы әсер көрсете алады [37].

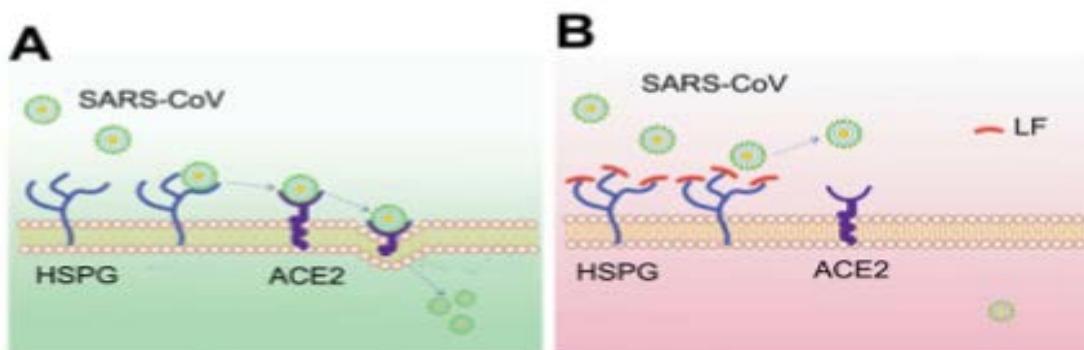
ЛФ ақуызы вирустық инфекцияны ингибиrtleуі қожайын жасушамен вирустың байланысуына кедергі келтіру әсерімен түсіндіріледі, болжам бойынша, оған жасушаның беткі жағында орналасқан молекулалар қатысуы мүмкін. Глюкозамингликондар, негізінен гепаран сульфаттар, сұтқоректілер жасушаларының беткі жағында болатын өте күшті аниондар, себебі оларға жоғары дәрежеде сульфаттану тән. Өте көп мөлшерде теріс зарядтың болуы нәтижесінде глюкозамингликондар катиондармен, ақуыздармен, ферменттермен, цитокиндермен, хемокиндермен, липопротеидермен, сонымен қатар әртүрлі патогендермен және вирустармен байланысуын қамтамасыз етеді. Кеңінен таралған әрі зерттелген механизмге сәйкес, ЛФ ақуызы гепаран сульфатпен байланысып, вирустың жасушамен алғашқы қатынасуына кедергі келтіреді және оның зақымдануынан қорғайды [41].

Көптеген зерттеулер, соның ішінде *in vitro* жүргізілген зерттеу нәтижесі көрсеткендей, адам қанындағы және сүтіндегі барлық ақуыздардың ішінде тек ЛФ ақуызы ғана ЖИТС -ке қарсы әсері өте жоғары. Бұл құбылыс қожайын жасуша ішінде вирус репликациясын ингибиrtleу қасиеттеріне негізделген [37]. Басқа зерттеулер нәтижесіне сәйкес, ЛФ ақуызының апо-формасы ротавирустың беліктерімен байланысып, гемаагглютинацияға және жасуша рецепторларымен вирустың қатынасқа түсүіне кедергі жасайды [68]. ЛФ ақуызының осы антивирустық белсендердің ақуыздың Fe^{3+} , Fe^{2+} иондармен, сонымен қатар Mg^{2+} және Zn^{2+} сияқты екі валентті металл иондарымен қанығуы артқан сайын төмендейді. Соңғы зерттеулер нәтижесіне сәйкес (2009), аденоvирустың нейтрализациясына ЛФ вирустың құрылымдық III және III ақуыздарымен тікелей байланысуы ықпал етеді [69]. ЛФ ақуызы сонымен қатар жасушадағы нақты бір вирустардың интернализациясын бұғаттайды. Бұған поливирус тип I, қарапайым герпес тип I және IIб цитомегаловирус жатады [36].

ЛФ ақуызы қожайын жасушаның қорғаныс молекуласы ретінде өте маңызды және оның физиологиялық белсендердің қабынуға, бактерияға, вирусқа қарсы, антиоксидантты,

иммуномодуляциялық, анти-карциногенді, антипротозоанды және санырауқұлақтарға қарсы [36]. Зерттеулерге сәйкес ЛФ ақуызының темірді ұстап қалу қабілеті иммундық жасушалардың қозғалғыштығын модуляциялауда және патогенді микроорганизмдердің есүін тежеуде де тиімді [51].

Коронавирус және лактоферрин. SARS-CoV инфекциясы кезінде қожайын жасушаның (ағзаның) вирусқа қарсы иммундық реакциясы басталады. Туа пайда болған иммундық жауап вирустық инфекцияны тежеуде маңызды рөл атқарады. SARS-CoV вирусына қарсы туа пайда болған иммундық жауапты белсендендірге ЛФ ақуызының әсері болатындығы айтылған [11]. ЛФ ақуызы SARS-CoV инфекциясы кезінде NK жасушаларының белсенделілігін арттырып, нейтрофилдердің агрегациясы мен адгезиясын ынталандыратынын көрсеткен. Алайда ЛФ ақуызының биологиялық белсенделілігі толық зерттелмеген.



Сурет 5 - SARS-CoV жасушага енуінің моделі және SARS-CoV инфекциясындағы лактофериннің қорғаныш рөлі [15]

(А) Жасушага SARS-CoV ену процесінде HSPG-лер маңызды рөл атқарады. HSPG-мен байланысу аландары SARS-CoV мен қожайын жасуша арасындағы алғашқы байланысуына мүмкіндік береді. SARS-CoV вирусы HSPG және ACE2-мен байланысуы арқылы жасуша мембранасына бекітіліп, ағзаға нақты кіру рецепторларын (ACE2) іздейді, осылайша жасушага енеді. (В) ЛФ ақуызы HSPG-мен байланысуы арқылы SARS-CoV инфекциясын блоктайды. ЛФ ақуызы жасуша бетіндегі HSPG-ге орналасады және вирус пен қожайын жасушалары арасындағы алдын-ала өзара әрекеттесуге және кейінгі ішкі процестерге жол бермейді [15].

Вирустар әдетте жасуша мембранасында ортақ молекулаларды жасушаларға енуін жеңілдету үшін пайдаланады. Бұл молекулалар, соның ішінде гепаран сульфатының протеогликандары (HSPGs) жасуша бетіндегі алғашқы вируспен байланысу аймақтарын қамтамасыз етіп қожайын жасушага енуге алғашқы байланыс орнатуға көмектеседі [38]. ЛФ ақуызы көптеген жасушаларда болатын HSPGs-пен байланыстыру арқылы кейбір вирустарды ағзаның ішкі жасушаларына енуіне кедергі келтіретіндігі көрсетілген [39].

ЛФ ақуызының бұл қасиеті қожайын жасушаны немесе ағзаны вирустық инфекциялардан қорғайды. Осы тұжырымдарға сүйене отырып, ЛФ ақуызының SARS-CoV-ге қарсы тағы бір әсері оның қожайын жасушаларында кең таралған HSPGs-молекуласымен байланысуымен болжанады. Жоғарыда келтірілген мәліметтерде, SARS псевдовирусының жасушага ену процесінде жасуша бетіндегі ACE2 мен HSPGs рецепторлары маңызды рөл атқаратындығын көрсетелген (сурет 5). ЛФ ақуызы SARS псевдовирус инфекциясын ACE2 мен HSPGs-пен байланысу арқылы бұғаттай алады, бұл SARS-CoV шабуылынан қожайын жасушаның иммундық жүйесінде қорғаныс рөлін атқара алады деп болжайды.

COVID-19 пандемиясымен күресу әдістері шектеу мен гигиеналық шараларды сақтаумен қатар, вирусқа қарсы препараттар мен вакциналар табылғанымен, әлі де жан-

жақты зерттеуді қажет етеді. ЛФ ақуызы тағамдық қоспа ретінде вирустарға, соның ішінде, SARS CoV-ға қоса алғанда, кең ауқымды вирустарға қарсы пайдалану мүмкіншілігі зерттелген. Аталған зерттеу жұмыстары бір туысқа жататын SARS CoV-2-ге жақын болуымен қызықты [9; 15]. SARS-CoV және SARS-CoV-2 тізбектерінің ұқсастығы 79% құрайды және олардың рецепторлармен байланысатын домен құрылымы да өте ұқсас. Сонымен қатар, ЛФ ақуызы тышқан-коронавирусындағы жасуша бетіндегі гепаран сульфаты протеогликандарымен (HSPGs), адамның коронавирусы hCOV-NL63 [64] және SARS-CoV [15] байланысуы вирустың белсенділігін тежейді. Бірақ, SARS-CoV-2 қожайын жасушаларына енүіне ЛФ ақуызының әсері туралы дәлелденген зерттеулер жоқ [65]. Кейбір науқастарда COVID-19 өлімі тек вирустық инфекцияға байланысты емес, гипер қабыну және цитокиндік ауру синдромымен де байланысты, бұл жедел респираторлық құйзеліске және одан кейін өлімге әкеледі [72]. COVID-19 ауыр жағдайларында цитокиндер мен интерлейкин IL-6, ісік некрозы факторы (TNFa) және ферритин денгейінің жоғарылауы байқалады [65]. ЛФ ақуызы вирустық инфекцияға қарсы иммундық және қабыну реакциясын модуляциялауы мүмкін, сондықтан ЛФ ақуызы COVID-19 ауыр жағдайларын қосымша емдеуге негіз бола алады.

Қорытынды

Сүттің ЛФ ақуызы маңызды тағамдық қоспа ретінде вирустық шабуылдарға қарсы тиімді, көптеген вирустық бөлшектермен немесе вирустық рецепторлармен байланысып, иммундық жүйені жақсартуға көмектеседі. Сонымен қатар, иммуномодуляциялық, қабынуға және вирусқа қарсы ерекше қасиеттері бар лактоферрин ақуызы COVID-19 үшін профилактикалық, алдын-алу және қосымша емдеу әдісі ретінде құнды потенциалға ие болуы мүмкін, себебі ол вирустық инфекцияны да, қожайын жасушанының иммундық реакциясын да қамтиды. Алайда, SAR-CoV-2 вирусы бойынша лактоферрин ақуызының тағамдық қоспасы туралы қосымша зерттеулер мен әзірлемелерді қажет етеді.

Әдебиеттер:

- 1 Wang L.F., Shi Z., Zhang S., Field H., Daszak P., Eaton B. Review of bats and SARS. *Emerg Infect Dis.*, 2006, 12(12):1834-1840.
- 2 Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 2013, 503(7477):535-538.
- 3 Chen Y., Guo D. Molecular mechanisms of coronavirus RNA capping and methylation. *Virol Sin.*, 2016, 31(1):3-11.
- 4 Cui J., Li F., Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbial.*, 2019, 17(3):181-192.
- 5 Cauchemez S., Van Kerkhove M.D., Riley S., Donnelly C.A., Fraser C., Ferguson N.M. Transmission scenarios for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) and how to tell them apart. *Euro Surveill.*, 2013, 18(24):20503.
- 6 Guan Y., Zheng BJ., He YQ., Liu XL., Zhuang ZX., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 2003, 302:276–278.
- 7 Rahman A., Sarkar A. Risk factors for fatal middle east respiratory syndrome coronavirus infections in Saudi Arabia: analysis of the WHO Line List, 2013-2018. *Am J Public Health*, 2019, 109(9):1288-1293.
- 8 Memish Z.A., Zumla A.I., Al-Hakeem R.F., Al-Rabeeah A.A., Stephens G.M. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl. J Med.*, 2013, 368(26):2487-2494.
- 9 Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92:418-423.
- 10 Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Niu P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382:727-733.
- 11 Shereen M.A., Khan S., Kazmi A., Bashir N., Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 2020, 94:91-98.
- 12 Kuchler H., Cookson C., Neville S. The \$2 bn race to find a vaccine. *Financial Times*, 2020, 7.

- 13 Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B., Jiang S. The Spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nature review Microbiology*, 2009, 7:226-236.
- 14 Chen J., Subbarao K. The Immunobiology of SARS. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25:443-472.
- 15 Lang J., Yang N., Deng J., Liu K., Yang P., Zhang G., Jiang C. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PLoS one*, 2011, 6: e23710.
- 16 Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Niu P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382:727-733.
- 17 Bartlam M., Yang H., Rao Z. Structural insights into SARS coronavirus proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15:664-672.
- 18 Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS Coronavirus Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Receptor. *Science*, 2005, 309:1864-1868.
- 19 Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y-M., Wang W., Song Z-G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- 20 Zhou P., Yang X., Wang X., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- 21 Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(3):457-460.
- 22 Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS. *Journal Virol*, 2020, 94(7): e00127-20. doi: 10.1128/JVI.00127-20.
- 23 Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3):325-328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
- 24 Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, 395(10224):565-574.
- 25 Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*, 2020, 92(4):418-423. doi: 10.1002/jmv.25681.
- 26 Hui D.S., Azhar E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 91:264-266.
- 27 SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses (mg-labmanager.s3.amazonaws.com/assets/articleNo/22279/iImg/41328/apr9-2020-ibs-1-sars-cov-2-attachment.jpg) мөн <http://uidemiz.kz/info/enter.html>
- 28 Gralinski L.E., Menachery V.D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 2020, 12(2):135. doi: 10.3390/v12020135.
- 29 Jayawardena R., Sooriyaarachchi P., Chourdakis M., Jeewandara C., Ranasinghe, P Enhancing immunity in viral infections, with special emphasis on COVID-19: A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 2020, 14:367-382.
- 30 Wu D., Lewis E.D., Pae M., Meydani S.N. Nutritional modulation of immune function: analysis of evidence, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in Immunology*, 2019, 9:3160.
- 31 Gombart A.F., Pierre A., Maggini S. A Review of micronutrients and the immune system working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*, 2020, 12:236.
- 32 Al-Hatim R.R., Al-Rikabi A.K., Ghadban A.K. The Physico-chemical properties of bovine and buffalo whey proteins milk by using ultrafiltration membrane Technology. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33:122-134.
- 33 Claeys W.L., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., Vandenplas Y. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 2013, 31:251-262.
- 34 Loss G., Depner M., Ulfman L.H., Van Neerven R.J., Hose A.J., Genuneit J., Weber J. Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 135:56-62.
- 35 Legrand D., Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*, 2010, 23:365-376.

- 36 Lepanto M.S., Rosa L., Paesano R., Valenti P., Cutone A. Lactoferrin in aseptic and septic inflammation. *Molecules*, 2019, 24:1323.
- 37 Borzenkova N.V., Balabushevich N.G., Larionova N.I., Lactoferrin: physicochemical properties, biological functions, delivery systems, drugs and biological additives (review). *Biopharmaceutical journal*, 2010, 2(3):3-19.
- 38 Baker H.M., Baker E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*, 2004, 17:209-216.
- 39 Legrand D., Pierce A., Elass E., Carpentier M., Mariller C., Mazurier J. Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008, 606:163-194.
- 40 Taylor S., Brock J., Kruger C., Berner T., Murphy M. Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004, 39:12-24.
- 41 Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33:301-308.
- 42 La O A.A. Isolation and structure-functional characterization of human colostral lactoferrin. *Biotechnol. Aplicada*, 2000, 17:177-182.
- 43 Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 2009, 91:3-10.
- 44 Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-Lobe of Lactoferrin: The Whole Story of the Half-Molecule. Review Article. *Biochemistry Research International*, 2013, 2013(271641):1-8.
- 45 Hu F., Pan F., Sawano Y., Makino T., Kakehi Y., Komiyama M., Kawakami H., Tanokura M. Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: A new antianemic edible material. *Int. Dairy J.*, 2008, 18:1051-1056. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.05.003.
- 46 Sorensen M., Sorensen S. Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. *The Proteins in Whey*, 1939, 83:432.
- 47 Moore S.A., Anderson B.F., Groom C.R., Haridas M., Baker E.N. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 274:222-236.
- 48 Conesa C., Sánchez L., Rota C., Pérez M.D., Calvo M., Farnaud S., Evans R.W. Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 150:131-139.
- 49 Okubo K., Kamiya M., Urano Y., Nishi H., Herter J.M., Mayadas T., Kurosawa M. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *E BioMedicine*, 2016, 10:204-215.
- 50 Iglesias-Figueroa B.F., Espinoza-Sánchez E.A., Siqueiros-Cendón T.S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International Dairy Journal*, 2019, 89:37-41.
- 51 Cheng J.B., Wang J.Q., Bu D.P., Liu G.L., Zhang C.G., Wei H.Y., Zhou L.Y., Wang J.Z. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91:970-976.
- 52 Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T.T. Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, 2009, 87:3-9.
- 53 Al-Majali A.M., Ismail Z.B., Al-Hami Y., Nour A.Y. Lactoferrin concentration in milk from camels (*Camelus dromedarius*) with and without subclinical mastitis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2007, 5:120.
- 54 El-Hatmi H., Girardet J., Gaillard J., Yahyaoui M.H., Attia H. Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum. *Small Ruminant Research*, 2007, 70:267-271.
- 55 Furmanski P., Li Z.P., Fortuna M.B., Swamy C.V., Das M.R. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170:415-429.
- 56 Berluttì F., Pantanella F., Natalizi T., Frioni A., Paesano R., Polimeni A., Valenti P. Antiviral properties of lactoferrin- A natural immunity molecule. *Molecules*, 2011, 16:6992-7018.
- 57 Anghel L. Lactoferrin: analysis of the structure profile. *Chemistry Journal of Moldova*, 2014, 9:99-106.
- 58 Gao C.H., Dong H.L., Tai L., Gao X.M. Lactoferrin-containing immunocomplexes drive the conversion of human macrophages from M2-into M1- like phenotype. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:37.

- 59 Rawat P., Kumar S., Sheokand N., Raje C.I., Raje M. The multifunctional glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a novel macrophage lactoferrin receptor. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, 90:329-338.
- 60 Takayama Y., Aoki R., Uchida R., Tajima A., Aoki Yoshida A. Role of CXC chemokine receptor type 4 as a lactoferrin receptor. *Biochemistry and Cell Biology*, 2017, 95:57-63.
- 61 Valenti P., Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62:2576-2587.
- 62 Shin K., Wakabayashi H., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K. Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31:1605-1608.
- 63 Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnadal B. Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62:2560.
- 64 Kell D.B., Heyden E.L., Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11:1221.
- 65 Milewska A., Zarebski M., Nowak P., Stozek K., Potempa J., Pyrc K. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. *Journal of Virology*, 2014, 88:13221-13230.
- 66 Azhar J., Mohammadabadi T., Babar M.E., Hussain T. Milk Lactoferrin: A Probable Immunological Agent Against SARS-CoV-2: A Review. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(2):138-146.
- 67 Puddu P., Valenti P., Gessani S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie*, 2009, 91:11-18.
- 68 Britigan B.E., Lewis T.S., Waldschmidt M., McCormick M.L., Krieg A.M. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *The Journal of Immunology*, 2001, 167:2921-2928.
- 69 Legrand D., Elass E., Carpentier M., Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochemistry and Cell Biology*, 2006, 84:282-290.
- 70 Queiroz V.A.O., Assis A.M.O., Júnior H.C.R. Protective effect of human lactoferrin in the gastrointestinal tract. *Revista Paulista de Pediatría*, 2013, 31:90-95.
- 71 Ishii K., Takamura N., Shinohara M. Longterm follow-up of chronic hepatitis C patients treated with oral lactoferrin for 12 months. *Hepatology Research*, 2003, 25:226-233.
- 72 Embleton N.D., Berrington J.E., Chris W.M., Cummings S.S. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2013, 18:143-149.
- 73 Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. Across Specialty Collaboration, U. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*, 2020, 395:1033-1034.

М.Х. НАРМУРАТОВА¹, А. БАЙДУЛЛАЕВА¹, А.Е. МУРАТБЕКОВА¹, Д.М. МАЗБАЕВА¹,
Ж.Б. НАРМУРАТОВА^{1,2*}

¹ Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

²Satbayev University, Алматы, Казахстан

*e-mail: janarka.90n@mail.ru

ОПИСАНИЕ СВОЙСТВА ЛАКТОФЕРРИНА МОЛОКА КАК ИММУНОМОДУЛЯТОРА ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРОНОВИРУСА

Аннотация

Недавнее появление нового коронавируса (2019 - nCoV), который вызвал вспышку необычной вирусной пневмонии у пациентов в Ухане, центральном городе Китая, является еще одним предупреждением о риске COV для здоровья населения. В условиях нынешней пандемии COVID-19, все больше внимания уделяется борьбе и профилактике заболеваний на основе многих противовирусных пищевых добавок. Лактоферрин является одной из естественных пищевых добавок, содержащихся в молоке домашних животных, и обладает иммуномодулирующим свойством из-за его способности удерживать железо и способности связываться с множеством клеточных рецепторов. Противовирусная способность лактоферрина была оценена в отношении

многих вирусов, включая SARS-CoV, который тесно связан с SARS-CoV-2 (возбудитель COVID-19). Необходимо провести специальные исследования потенциала LF против SARS-CoV-2, поскольку он может предотвращать или препятствовать заражению клеток SARS-CoV-2 из-за биологической активности LF в отношении противовирусного иммунитета. Мы надеемся, что дальнейшие исследования по оценке фармакологического эффекта лактоферрина против SARS-CoV-2 подтвердят его роль в борьбе с COVID-19.

Ключевые слова: лактоферрин, SARS-CoV-2, COVID-19, иммуномодуляция.

IRSTI: 619:630:.5767.8

M.KH. NARMURATOVA¹, A. BAYDULLAEVA¹, A.E. MURATBEKOVA¹,
D.M. MAZBAYEVA¹, ZH.B. NARMURATOVA^{1,2*}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Satbayev University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: janarka.90n@mail.ru

DESCRIPTION OF THE PROPERTIES OF MILK LACTOFERRIN AS AN IMMUNOMODULATOR AGAINST THE CORONAVIRUS CAUSES

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.03

Abstract

A recent of a novel coronavirus due to the emergence of a new coronavirus (2019-nCoV) in the Wuhan, central China caused by the development of specific viral pneumonia in patients was a significant public health concern. During the current COVID-19 pandemic, much attention is being paid to the fight and prevention of the disease on the basis of many dietary supplements. Lactoferrin is one of the natural nutritional supplement found in mammalian milk and has immunomodulatory properties based on its ability to bind iron and bind to many cell receptors. Lactoferrin has been showed the antiviral activity against SARS-CoV and other SARS-CoV-2 related viruses (the causative agent of CoVID-19). A special research is needed to study the anti-SARS-CoV-2 ability of lactoferrin. Since lactoferrin possesses biological activity against antiviral immunity, lactoferrin may inhibit SARS-CoV-2 cell infection in the host cells. We are optimistic that further studies assessing the pharmacological effects of lactoferrin against SARS-CoV-2 will amplify its role in combating COVID-19.

Keywords: lactoferrin, SARS-CoV-2, COVID-19, immunomodulation.

A virus is a body consisting of genetic material and several proteins. A pathogen capable of reproduction by penetration into a living organism. Coronavirus (CoV) is a type of virus belonging to the *Coronaviridae* family of the Kingdom of Virus, formed by a combination of the words corona (crown) and *viridae* (virus). CoV-affects the respiratory tract, gastrointestinal tract, liver and central nervous system of humans, domestic animals, birds, bats, mice and many other wild animals [1-3]. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) - is an infectious and potentially fatal respiratory disease. SARS is the result of infection with a coronavirus, which scientists have called the SARS-related coronavirus (SARS-CoV). In 2002-2003, SARS spread to 33 countries on 5 continents, as a result of which more than 8000 people became infected and 700 died [4-6], and in 2012 more than 2,428 people became infected with respiratory syndrome (MERS-Middle East respiratory syndrome) in the Middle East, 838 people died and were under strict control. Like the outbreak of this epidemic, the newly emerged CoV showed the presence of a malignant epidemic in terms of the possibility of rapid transmission from animals to humans and from human to human [7-8]. In 2019, an outbreak of pneumonia, unknown to the population, which occurred in mid-December at the Huanan Animal and seafood market in Wuhan, which is part of Hubei Province, located in central China, attracted the attention of the whole world. As a result of a strict sequence and etiological studies in Chinese scientific laboratories, a new coronavirus (novel coronavirus (nCoV)) was identified as the causative agent of unknown pneumonia (<http://virological.org/> and

<https://www.gisaid.org/>). After that, Chinese scientists named a new type of coronavirus-SARS-CoV-2. It was found that its genetic structure is 70% similar to the SARS-CoV virus, which causes severe acute respiratory syndrome. On January 12, 2020, the World Health Organization temporarily named the new virus the 2019 new coronavirus (2019 - nCoV) [9]. The main route of transmission of SARS-CoV-2 can occur through the external surface of objects, in particular, at the moment when an infected person coughs or massages the face, eyes, nose with the part of the body that the infected person touches [10]. However, it is unknown how long the virus will live in these places. Thus, the virus enters the body, multiplies and spreads to other organs. The main damaging forms are the intestine, spleen and the most dangerous damaging organ of the lungs. People infected with the virus have mild and severe clinical manifestations of dry cough, fever, shortness of breath, bilateral pneumonia and other symptoms, including sore throat, diarrhea and vomiting [10]. Sick patients may be in close contact with infected people and respiratory droplets [11]. A variety of antiviral treatments are offered. However, the human testing period may last for months or a year [12]. The current method of combating the pandemic is isolation, personal hygiene measures and a healthy diet.

The emergence and outbreaks of new CoV species have shown that this is a global malignant epidemic that is dangerous to health. In the future, due to climate change and ecology, as well as the strengthening of human relations with animals, a dangerous epidemic may flare up again. Thus, there was a need for immediate therapy and the development of vaccines against CoV. We hope that the data provided in the article will contribute to the prevention and protection from the new coronavirus epidemic, which has turned it into a global pandemic.

The path of penetration of the coronavirus into the cell. The penetration of coronavirus into a human cell consists of the following stages. 1. A virus that has entered the body with the help of the organs of the nose, mouth or eyes of a person is directed to the protein receptor of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) (Figure 1). ACE2 is a metallopeptidase, one of the important functional receptors of SARS-CoV-2. The angiotensin converting enzyme receptor 2 is located on the surface of cells that make up some organs, in particular, the mucous membrane of the mouth and nose, lungs, stomach, small intestine, colon, lymph nodes, thymus gland, bone marrow, liver, spleen, kidneys and brain. The ACE2 receptor is very often found on the surface of the epithelial cells of the lung alveoli [13].

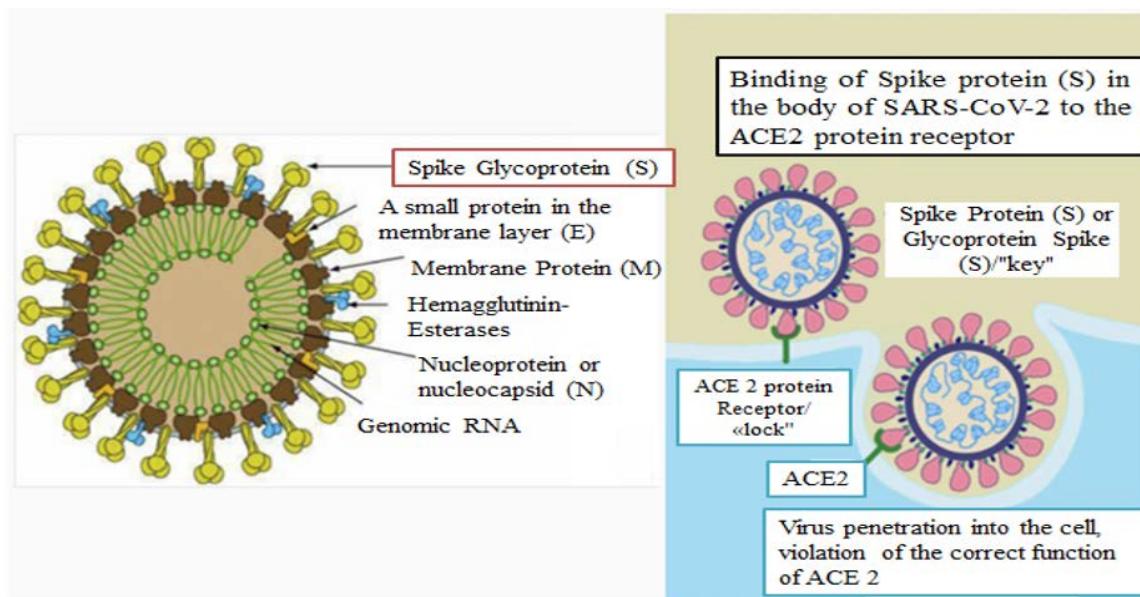


Figure 1 - The binding of a coronavirus cell and its binding to the ACE 2 receptor is shown [27]

As shown in the first figure, after the coronavirus virus recognizes the angiotensin converting enzyme receptor 2 from the cell surface, the specified receptor and the Spike protein (S) firmly

bind to each other as a "key" and "lock". As shown in crystallographic studies, the S1 segment (318-510 amino acid residues) is a region that binds to receptors important for the angiotensin converting enzyme receptor 2 [13-15]. Under the influence of a strong bond, the function of the ACE 2 receptor involved in the regulation of blood pressure is disrupted. As a result, with the help of the angiotensin converting enzyme receptor 2, the SARS-CoV-2 virus penetrates into the cell of the human body [16]. Once inside the cell, the coronavirus virus releases the entire structural protein layer surrounding it from the outside [15].

In the above sequence, SARS-CoV-2 itself or only genomic RNA enters the cytoplasm. Meanwhile, the RNA genome of the SARS-CoV virus has a length of about 30,000 nucleotides [17]. At the next stage of virus penetration into the cytoplasm, the stage of translation of the proteins responsible for the virus, RNA-a protein that has penetrated into the cytoplasm, begins. The process of doubling occurs based on the process of replication of genomic RNA penetrating the cytoplasm. Before replicating RNA, SARS-CoV-2 needs important proteins that replicate RNA. The formation of these proteins using viral RNA as a source of material is called translation. During the implementation of this process, the SARS-CoV-2 virus parasitizes the host cell (Figure 2).

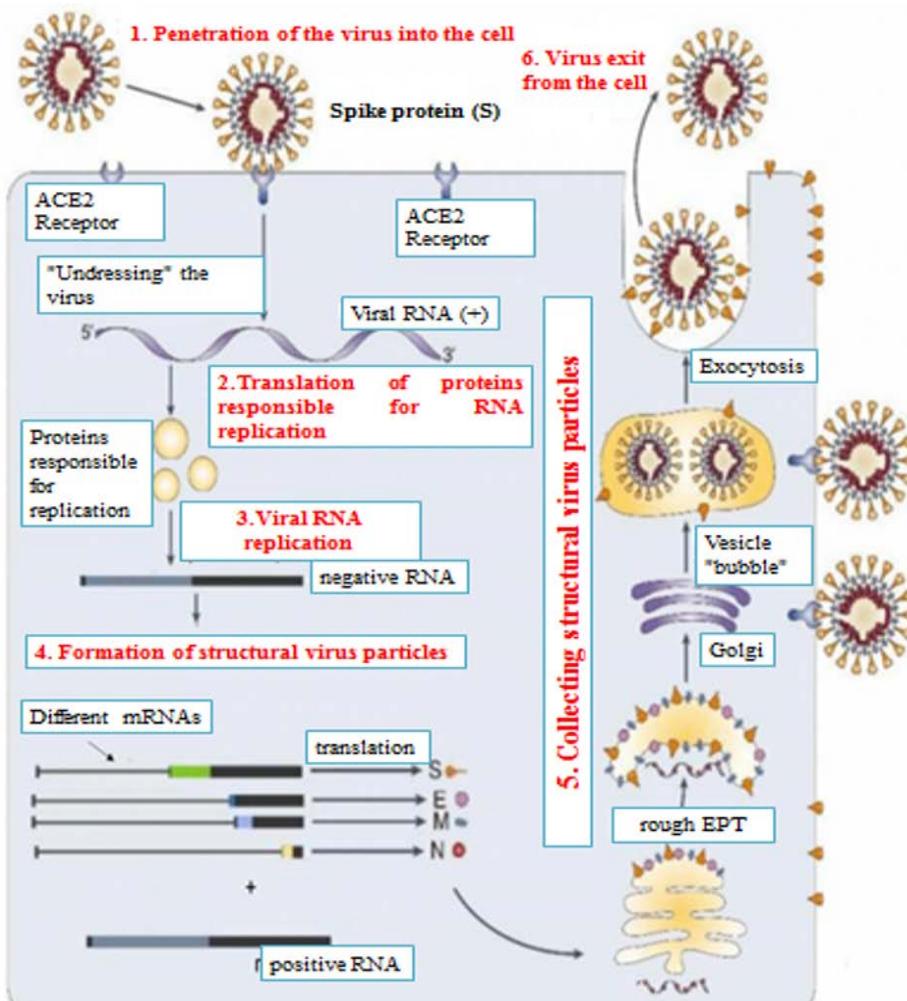


Figure 2 - Diagram of the pathway of the SARS-CoV-2 virus into the cell [27]

The third stage is the replication of the virus RNA. It works in the process of viral RNA replication after the formation of proteins responsible for the replication of secondary RNA. Mentioned, SARS-CoV-2-positive RNAs are among the viruses. After the replication stage is completed, negative RNA is formed from positive RNA. After that, at the fourth stage, the formation of structural particles of the virus begins. Particles of the structure of new viruses begin to form from the negative RNA of SARS-CoV-2. Using negative RNA as a source of material,

several mRNAs are formed. As a result, structural proteins of the virus are formed from mRNA, such as glycoprotein s-protein, membrane protein (M), small protein (E), nucleocapsid (N). At the fifth stage, after structural proteins are formed inside the EPT, proteins and RNA pass into the Golgi apparatus. Inside the Golgi apparatus, structural proteins and positive RNA are combined into a complete virus, and the vesicle is placed inside the "bubbles". At the sixth stage, the fully accumulated virus inside the vesicle begins to exit the cell during exocytosis. A fully developed virus attacks other cells [19-28].

The body's resistance to the virus is closely related to the system of healthy nutrition. Foods enriched with natural biologically active substances can reduce the risk of viral infections in the body [29]. In improving immunity, such components in food increase the activity of Vit cells and participate in their proliferation, induction and modulation of the innate and adaptive immune response [30-31]. Based on the above data, optimal nutrition is the only sustainable way for the immune system to resist COVID-19.

Among food products, milk and dairy products are useful for the immune system with their valuable proteins [32]. Epidemiological studies have shown that regular consumption of cow, mare and camel milk is characterized by a low prevalence of bacterial and viral infections in humans [33-34]. One of the important components of milk is lactoferrin (LF), a multifunctional protein belonging to the genus of transferrins.

The immunoprotective and anti-inflammatory properties of the lactoferrin protein, which provide protection against respiratory viruses such as SARS-CoV-2, have been shown in a number of scientific articles [9;15;35]. To study the potential of LF in immune protection against COVID-19, it is necessary to know its biology, structure, binding of membrane receptors, immunomodulatory and antiviral mechanisms, as well as its sources. The article discusses the preventive, therapeutic, immunoprotective and mechanism of action of lactoferrin against viruses, and also discusses the role of lactoferrin protein as an additional method of treatment of COVID-19.

Structure and physico-chemical properties of lactoferrin. The LF protein is a heme-free iron-binding glycoprotein belonging to the transferrin (TF) group. It was first isolated from cow's milk in 1939, and from mother's milk in 1960. The amino acid sequence of LF was determined in 10 animal species (human, cow, mouse, horse, pig, goat, sheep, buffalo and camel) [36-37]. The LF protein molecule consists of a single polypeptide chain consisting of approximately 700 amino acid residues. The molecular weight is ~ 76-80 kDa. The similarity of the primary structure of the human and mouse LF protein is 70%, human and cow — 69%, cow and mouse — 63% [38]. The primary structure of human LF protein has a high degree of similarity (~ 59%) with human serum TF. Transcription of the LF gene under the influence of alternative promoters - P1 and P2 - leads to the formation of two products: LF mRNA and delta-LF (Δ -LF) [39]. Δ -LF does not perform functions due to the absence of an N-terminal signal sequence [40]. The isoelectric point of the human LF in the literature is 8.0-8.5 [41]; ranges from 8.7 to 9.7 [42].

The polypeptide chain of the DA protein consists of two homologous globular fractions C and T. The similarity of the amino acid composition in the two fractions is about 37%. Fraction N forms the N-end of the polypeptide chain (1-332 amino acid residues), fraction C forms the C-end (345-691 amino acid residues). They are connected by a short alpha helix (amino acid 333-344), this compound gives the molecule an additional elastic property [37]. Each lobe has an ellipsoidal shape with dimensions of the order of $55 \times 35 \times 35$ Å. The protein molecule is not symmetrical, since its parts are rotated at an angle of ~ 150° to each other and shifted by 25 Å. Each lobe, in turn, consists of two domains with a very similar secondary structure [37; 43]. The molecule consists of ≈ 43% α -helix and ≈ 27% β -helix. The protein structure has 16 disulfide bonds, 6 pairs of which are equal in both lobes, and the remaining 4 pairs are located in the C-lobe. The general scheme of the bovine lactoferrin protein molecule is shown in the third figure.

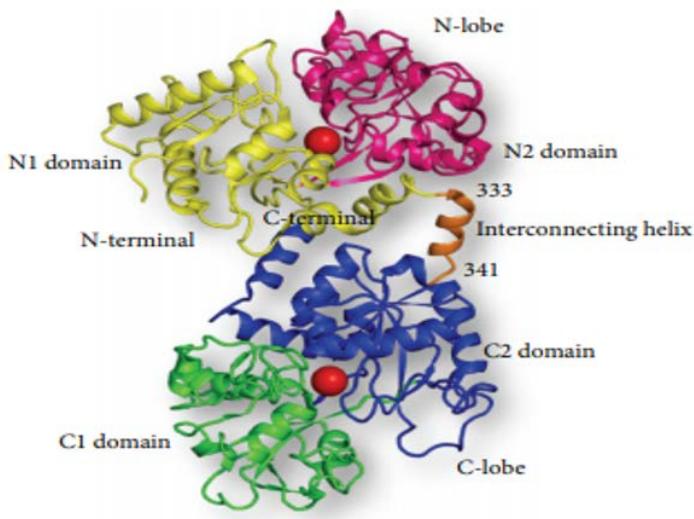


Figure 3 - Diagram of the bovine lactoferrin protein molecule

Domains N1 and N2 are marked in yellow and pink, respectively, and domains C1 and C2 are green and blue, respectively, and the interconnected spiral between the petals is orange, and two iron atoms are shown by red spheres [44]

LF exists in two different forms: apo (an iron-unsaturated protein) and holo (with Fe^{3+} in the active center). The LF protein molecule is able to reversibly bind to two Fe^{3+} ions. The deeper region between the domains (N1, N2 and C1, C2) in each lobe contains iron binding sites of ~42 Å in size. Each iron atom is coordinated with four protein ligands: Tyr-92 and Tyr-192 with two oxygen atoms in phenolate ions (Tyr - 435 and Tyr-528 at the C-terminus, respectively), His - 253 (His - 597) with a nitrogen atom N2 in imidazole and Asp-60 (Asp-395) with carboxylic oxygen. Each iron atom has an octahedral environment, but four protein ligands occupy only four positions out of six. According to studies, the remaining two positions contain CO_3^{2-} or HCO_3^- anions [37; 43].

The scheme of binding of LF to iron is shown (Figure 4). The iron atom is represented by a red sphere, and the interacting amino acid residues of LF are yellow. The residue numbers correspond to the N-terminus, and the amino acid residues corresponding to the C-terminus are indicated in parentheses [44].

The anion binds to the positively charged N-terminal of the peptide and the Arg121 radical. In mutagenesis experiments, it has been proven that the replacement of any 4 residues in the active center leads to an immediate deterioration in the ability of iron binding. Mutation of the Arg-121 residue leads to the same effect [38; 43].

Iron binds strongly and irreversibly ($K_d \sim 10^{-20} \text{ M}^{-1}$) to the LF protein. The LF protein is able to bind iron even with a competing ligand (for example, citrate) at pH 3.0, while other TF proteins secrete iron at pH ~5.5 [37]. The different properties of LF and TF are determined by the harmonious union of the two lobes of LF [38]. Binding of iron to the C-fraction of DA additionally stabilizes its binding (iron to protein) in the T-fraction. An important role here is played by the alpha helix at the C-end, which interacts with the N-lobe. The absence of this phenomenon in TV is explained by the peculiarity of the structure of the peptide connecting the two lobes of LF. In all described LFS, this peptide forms an alpha helix, whereas in TF it has a weak, straight, disordered structure. The strength of the alpha helix ensures tight binding of the two lobes and stabilizes the binding of iron to the N-lobe. As a result, this affects the release of iron (from the LF) and shifts the pH value towards the lower limit. The presence of lysine residues - Lys-206 and Lys-296 - in the ATP molecule may be the reason for the difference in the functions of LF and TF. These two residues form a unique hydrogen bond. Arg-210 and Lys-301 of the human DA protein are replaced by this pair of residues. However, the proteins of cows, buffaloes, horses and camels

contain two lysine residues similar to the position in NA - Lis-2010 and Ls-301. However, no connection is formed between these two residues and, accordingly, protein specificity is not observed [37-38].

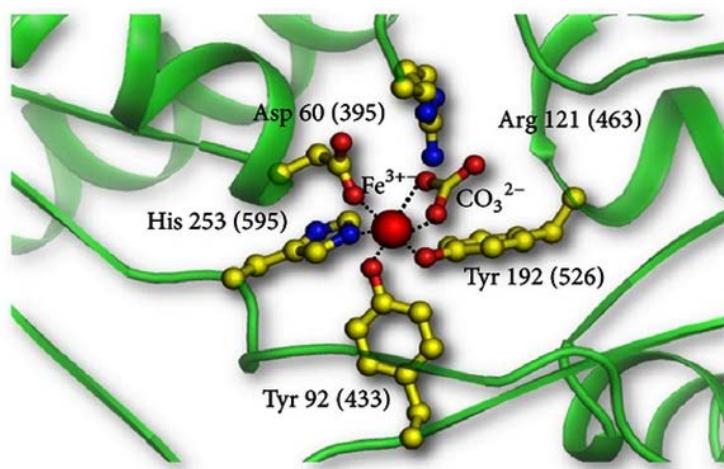


Figure 4 - Scheme of iron binding by lactoferrin [26]

The binding and release of iron with protein leads to structural changes in the LF protein [37]. The LF protein binds to iron in an open structure: first of all, it binds to the anion, which leads to the displacement of ligands. Then iron completely binds to the LF protein molecule, and then LF passes into a very compact structural form, that is, a closed structural form. The apo form of the LF protein can bind to other metal ions, usually with strongly positively charged ion иондар (Cr^{3+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , lanthanide ions) [37-38]. The mentioned metal ions bind to the LF protein through amino acids that bind Fe^{3+} . In addition, it has been shown that the LF protein can bind up to 70 Fe^{3+} ions using sections of the peptide chain [45]. As a result, a substance consisting of 15-16 LF protein molecules is formed. This substance has a very high stability compared to the native protein. The stability increase is based on the electrostatic coupling between Fe^{3+} and HCO_3^- ions present in the composition of various LF protein molecules in this substance [37].

The LF protein is a globular glycoprotein [39]. The carbohydrate fragment forms a glycosidic bond with the protein via asparagine amide nitrogen (Asn-137 and Asn-490). The number and location of glycoside bonds in the LF varies depending on the type of animal [37; 39]. Many LF functions are determined by its unevenly distributed surface charge. Three positively charged regions can be distinguished: N-at the end (residues 1-5), in the first alpha helix (residues 12-31) and between the two lobes. The GRRRR signal sequence at the N-end of the human LF ensures the penetration of this protein into the nucleus. Thus, it acts as a transcription factor. The above signal scheme is characteristic only for human LF, it is absent in other animals [37].

Sources of lactoferrin. The LF protein is secreted by epithelial cells of the mucous membrane of various mammals [46-50]. LF protein comes from all exocrine iron juices: lacrimal (2 mg/ml [41; 46-50] or 0.4 mg/ml), saliva (0.013 mg/ml), nasal and bronchial, bile juices (0.0042 mg/ml), pancreatitis juices, seminal fluid (0.518 mg/ml), urine (0.00005 mg/ml), sweat (0.0025 mg/ml). LF is contained in very large quantities in milk (1.28 mg/ml) and colostrum (7 mg/ml or 3.2 mg/ml) [37; 51]. The most common protein after casein in milk. The concentration of LF in cow's milk varies from 31.78 to 485.63 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ depending on the lactation period, the breed of cows [51], and its concentration in colostrum is 1-5 mg / ml. In addition, the concentration of lactoferrin in camel milk is 20-2100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ [52-53] [30]. Studies show that camel milk lactoferrin varies from 0.02 to 7.28 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ in regular milk, but the maximum amount of lactoferrin is 2.3 g.L^{-1}

approximately 48 hours after calving. is the value [54]. Since the biological activity of bovine and human LF is similar, this allows the use of animal milk as an available source of lactoferrin protein. In the mammary glands, the secretion of LF protein (transcription and translation) is controlled by prolactin, and the expression of LF protein in the genital tract is induced by the steroid hormone estrogen. In the hematopoietic system, LF is expressed (synthesized) in neutrophils that develop at the stage of maturation of myelocytes [37]. Accumulates in secondary neutrophil granules. The protein content in them is 15-15 mcg/10⁶ [40]. In addition, LF was detected in blood (0.001 mg/ml) and amniotic fluid (0.006 mg/ml). The normal amount in the blood is about 1 mcg/ml, although with inflammation its amount can reach 200 mcg/ml [37].

Three different isoforms of lactoferrin are known, which include alpha-LF (LF- α), beta-LF (LF- β) and gamma-LF (LF-g). LF- α binds iron, but the other two isoforms, LF- β and LF-g, do not bind to iron [55-57].

Immunomodulatory effect of lactoferrin. The mechanism of binding of the LF protein to membrane receptors indicates its biological activity. LF binds to the following receptors: TLR2, TLR4 [58], CD14 [59], cytokine receptors [60] and Intelectin-1 [61]. It has been suggested that all these receptors are found in many types of cells and tissues, including lymphocytes and intestinal epithelial cells [62]. The ability of the LF protein to bind to receptors is important for increasing its antiviral immunity and the body's defense mechanism. The LF protein performs its immunomodulatory activity by competing with infectious molecules, thereby suppressing particle fusion [63]. The specificity of the LF protein lies in the fact that heparan sulfate binds to proteoglycans (HSPGs), the receptor for attachment and introduction of SARS-CoV and human coronavirus NL63 into the cell [6; 64]. SARS-CoV-2 uses ACE2 as its functional receptor, but can bind to heparan sulfate proteoglycans (HSPG), since SARS-CoV has been found to bind both receptors, however, studies of the use of HSPG for SARS-CoV-2 have not been fully proven. Epithelial cells are considered the first physical barrier preventing the penetration of harmful substances, and play an important role in innate immunity [65].

The LF protein plays an important role in the immune system and the defense system of infection and inflammation [61]. Some of its immunomodulatory effects are based on lipopolysaccharide complexes (LPS). The LF protein binds to the LPS associated with the virus, thereby preventing the virus from entering the cell, but when the virus enters the cell, it suppresses the reproduction of the virus, stimulating killer cells such as granulocytes and macrophages [65]. The LF protein participates in the regulation of cytokine/chemokine and peroxide production [66-67], activation and proliferation of immune cells, in particular macrophages, neutrophils, basophils, eosinophils, mastocytes and dendritic cells [35]. The phagocytic capacity of cells is modulated by the recognition of certain LF protein binding sites [68].

The LF protein delivered to the nucleus binds to DNA and activates various signaling pathways [41; 69]. Tumor necrosis of LF was detected using interferongamma, Alpha factor and inhibitory activity of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL) -1, IL-2 and IL-6. In addition, at the cellular level, LF enhances the absorption of polymorphic nuclear blood cells and stimulates the myelopoietic process [41]. Also, in chronic diseases, LF increases the profile of Th1 cytokines in peripheral blood [70].

The lactoferricin peptide obtained as a result of the degradation of LF limits the onset of the inflammatory process, increases the production of IL-10, thereby stimulating Th2 (anti-inflammatory) activity. LF interference occurs as a result of the expression of the fibroblast gene, modulates protein production and changes the extracellular matrix, thereby increasing the mobility of immune cells [71].

Antiviral effect of lactoferrin protein. The LF protein has antiviral properties that suppress most RNA and DNA viruses infecting humans and animals. There are two types of antiviral action of the LF protein. Firstly, it can inhibit the binding stage of the virus to the host cell, such as herpes, hepatitis B, human cytomegalovirus, adeno-, rota- and polioviruses. Secondly, it suppresses the process of virus replication in affected cells (hepatitis C and G, AIDS). In the early stages of the damage process, the protein can have an antiviral effect [37].

The inhibition of the LF protein of viral infection is explained by the effect that prevents the binding of the virus to the host cell, presumably because molecules located on the cell surface can participate in it. Glucosaminglycones, mainly heparan sulfates, are very strong anions present on the surface of mammalian cells because they are characterized by a high degree of sulfation. As a result of the presence of a very large amount of negative charge, glucosamine glycones provide binding to cations, proteins, enzymes, cytokines, chemokines, lipoproteins, as well as to various pathogens and viruses. According to a widespread and studied mechanism, the LF protein binds to heparan sulfate, preventing the primary interaction of the virus with the cell and protecting it from damage [41].

Numerous studies, including an *in vitro* study, have shown that of all the proteins in human blood and milk, only LF protein has a very high effect against AIDS. This phenomenon is based on the properties of inhibiting virus replication inside the host cell [37]. According to the results of other studies, the apo-form of the LF protein binds to parts of the rotavirus, preventing hemagglutination and interaction of the virus with cellular receptors [68]. This antiviral activity of the LF protein decreases with increasing saturation of the protein with Fe³⁺, Fe²⁺ ions, as well as divalent metal ions such as Mg²⁺ and Zn²⁺. According to the results of recent studies (2009), direct binding of LF to structural proteins III and III A of the virus contributes to the neutralization of adenovirus [69]. The LF protein also blocks the internalization of certain viruses in the cell. This includes type I polyvirus, type I herpes simplex and ATC cytomegalovirus [36].

The LF protein is very important as a protective molecule of the host cell, and its physiological activity can be anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antioxidant, immunomodulatory, anticarcinogenic, antiprotozoal and antifungal [36]. According to studies, the ability of the LF protein to retain iron is also effective for modulating the mobility of immune cells and suppressing the growth of pathogenic microorganisms [51].

Coronavirus and lactoferrin

During SARS-CoV infection, the immune response of the host cell (organism) against the virus begins. The innate immune response plays an important role in suppressing viral infection. It has been suggested that the LF protein has an effect on the activation of the innate immune response against the SARS-CoV virus [11]. LF protein has been shown to increase NK cell activity during SARS-CoV infection and stimulate neutrophil aggregation and adhesion. However, the biological activity of the LF protein has not been fully studied.

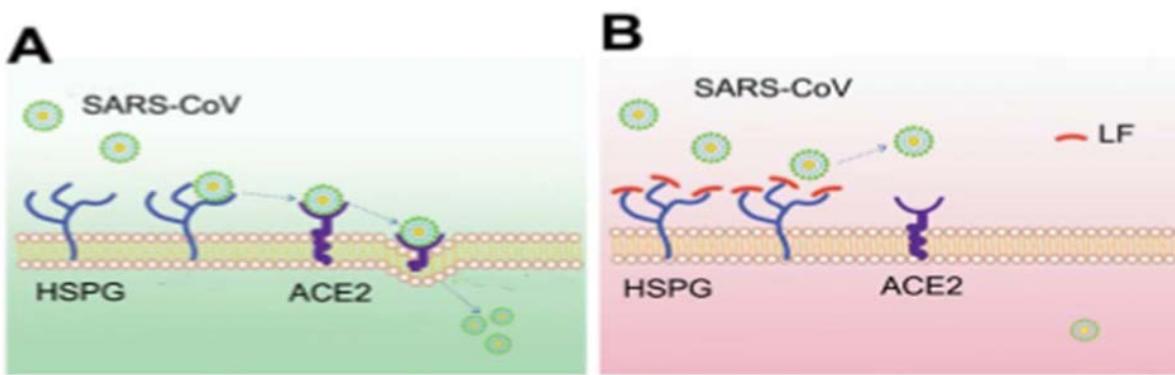


Figure 5 - Model of SARS-CoV cell penetration and the protective role of lactoferrin in SARS-CoV infection [15]

(A) HSPGs play an important role in the process of SARS-CoV penetration into the cell. HSPG binding sites allow primary binding between SARS-CoV and the host cell. The SARS-CoV virus attaches to the cell membrane by binding to HSPG and ACE2, looking for specific entry receptors (ACE2), thereby penetrating into the cell. (B) The LF protein blocks SARS-CoV

infection by binding to HSPG. The LF protein is deposited in hsgp on the cell surface and prevents preliminary interaction and subsequent internal processes between the virus and host cells [15]

Viruses typically use common molecules on the cell membrane to facilitate entry into cells. These molecules, including heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), help establish the first contact for penetration into the host cell by providing binding sites to the first virus on the cell surface [38]. It has been shown that the LF protein prevents the penetration of some viruses into the internal cells of the body by binding to HSPGs present in many cells [39].

This property of the LF protein protects the host cell or organism from viral infections. Based on these findings, another effect of the LF protein against SARS-CoV is predicted by its binding to the HSPGs -molecule, which is widespread in host cells. The above data show that during the penetration of the SARS pseudovirus into the cell, the ACE2 and HSPGs receptors on the cell surface play an important role (Figure 5). The LF protein can block SARS pseudovirus infection by binding to ASE2 and HSPGs, suggesting that it may play a protective role in the host cell's immune system against SARS-CoV attack.

Methods of combating the COVID-19 pandemic, in addition to compliance with restrictions and hygiene measures, still require comprehensive study, although antiviral drugs and vaccines have been discovered. The possibility of using LF protein as a dietary supplement against a wide range of viruses, including SARS CoV, has been studied. These research papers are interesting because they are close to SARS CoV-2, belonging to the same relative [9; 15]. The similarity of the SARS-CoV and SARS-CoV-2 sequences is 79%, and their receptor-binding domain structure is also very similar. In addition, the binding of LF protein to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface (HSPGs) in mouse coronavirus, human coronavirus HCoV-NL63 [64] and SARS-CoV [15] suppresses the activity of the virus. But there are no proven studies of the effect of the LF protein on the penetration of SARS-CoV-2 into host cells [65]. In some patients, death from COVID-19 is associated not only with viral infection, but also with hyperinflammatory and cytokine disease syndrome, which leads to acute respiratory distress and subsequent death [72]. In severe cases of COVID-19, an increase in the level of cytokines and interleukin IL-6, tumor necrosis factor (TNFa) and ferritin is observed [65]. The LF protein can modulate the immune and inflammatory response against viral infection, so the LF protein can serve as a basis for further treatment of severe cases of COVID-19.

Conclusion

The LF protein in milk is effective against viral attacks as an important dietary supplement, binds to many viral particles or viral receptors and helps strengthen the immune system. In addition, the lactoferrin protein, which has special immunomodulatory, anti-inflammatory and antiviral properties, may have valuable potential as a preventive, preventive and complementary treatment for COVID-19, since it includes both viral infection and the immune response of the host cell. However, more research and development is needed regarding the lactoferrin protein dietary supplement for the SARS-CoV-2 virus.

References:

- 1 Wang L.F., Shi Z., Zhang S., Field H., Daszak P., Eaton B. Review of bats and SARS. *Emerg Infect Dis.*, 2006, 12(12):1834-1840.
- 2 Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 2013, 503(7477):535-538.
- 3 Chen Y, Guo D. Molecular mechanisms of coronavirus RNA capping and methylation. *Virol Sin.*, 2016, 31(1):3-11.
- 4 Cui J., Li F., Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.*, 2019, 17(3):181-192.
- 5 Cauchemez S., Van Kerkhove M.D., Riley S., Donnelly C.A., Fraser C., Ferguson N.M. Transmission scenarios for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) and how to tell them apart. *Euro Surveill.*, 2013, 18(24):20503.
- 6 Guan Y., Zheng BJ., He YQ., Liu XL., Zhuang ZX., et al. Isolation and characterization of

- viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 2003, 302:276–278.
- 7 Rahman A., Sarkar A. Risk factors for fatal middle east respiratory syndrome coronavirus infections in Saudi Arabia: analysis of the WHO Line List, 2013-2018. *Am J Public Health*, 2019, 109(9):1288-1293.
- 8 Memish Z.A., Zumla A.I., Al-Hakeem R.F., Al-Rabeeah A.A., Stephens G.M. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl. J Med.*, 2013, 368(26):2487-2494.
- 9 Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92:418-423.
- 10 Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Niu P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382:727-733.
- 11 Shereen M.A., Khan S., Kazmi A., Bashir N., Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 2020, 94:91-98.
- 12 Kuchler H., Cookson C., Neville S. The \$2 bn race to find a vaccine. *Financial Times*, 2020, 7.
- 13 Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B., Jiang S. The Spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nature review Microbiology*, 2009, 7:226-236.
- 14 Chen J., Subbarao K. The Immunobiology of SARS. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25:443-472.
- 15 Lang J., Yang N., Deng J., Liu K., Yang P., Zhang G., Jiang C. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PLoS one*, 2011, 6: e23710.
- 16 Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Niu P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382:727-733.
- 17 Bartlam M., Yang H., Rao Z. Structural insights into SARS coronavirus proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15:664-672.
- 18 Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS Coronavirus Spike Receptor-Binding Domain Complexed with Receptor. *Science*, 2005, 309:1864-1868.
- 19 Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y-M., Wang W., Song Z-G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, 579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- 20 Zhou P., Yang X., Wang X., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- 21 Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*, 2020, 63(3):457-460.
- 22 Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS. *Journal Virol*, 2020, 94(7): e00127-20. doi: 10.1128/JVI.00127-20.
- 23 Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3):325-328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001.
- 24 Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, 395(10224):565-574.
- 25 Chen Y., Liu Q., Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*, 2020, 92(4):418-423. doi: 10.1002/jmv.25681.
- 26 Hui D.S., Azhar E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health-The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 91:264-266.
- 27 SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses (mg-labmanager.s3.amazonaws.com/assets/articleNo/22279/iImg/41328/apr9-2020-ibs-1-sars-cov-2-attachment.jpg) мен <http://uidemiz.kz/info/enter.html>
- 28 Gralinski L.E., Menachery V.D. Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 2020, 12(2):135. doi: 10.3390/v12020135.
- 29 Jayawardena R., Sooriyaarachchi P., Chourdakis M., Jeewandara C., Ranasinghe, P Enhancing immunity in viral infections, with special emphasis on COVID-19: A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 2020, 14:367-382.
- 30 Wu D., Lewis E.D., Pae M., Meydani S.N. Nutritional modulation of immune function: analysis

of evidence, mechanisms, and clinical relevance. *Frontiers in Immunology*, 2019, 9:3160.

31 Gombart A.F., Pierre A., Maggini S. A Review of micronutrients and the immune system working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*, 2020, 12:236.

32 Al-Hatim R.R., Al-Rikabi A.K., Ghadban A.K. The Physico-chemical properties of bovine and buffalo whey proteins milk by using ultrafiltration membrane Technology. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33:122-134.

33 Claeys W.L., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., Vandenplas Y. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 2013, 31:251-262.

34 Loss G., Depner M., Ulfman L.H., Van Neerven R.J., Hose A.J., Genuneit J., Weber J. Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 135:56-62.

35 Legrand D., Mazurier J. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*, 2010, 23:365-376.

36 Lepanto M.S., Rosa L., Paesano R., Valenti P., Cutone A. Lactoferrin in aseptic and septic inflammation. *Molecules*, 2019, 24:1323.

37 Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларинова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки. *Биофармацевтический журнал*, 2010, 2(3):3-19.

38 Baker H.M., Baker E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*, 2004, 17:209-216.

39 Legrand D., Pierce A., Elass E., Carpentier M., Mariller C., Mazurier J. Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008, 606:163-194.

40 Taylor S., Brock J., Kruger C., Berner T., Murphy M. Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004, 39:12-24.

41 Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S., Rascon Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33:301-308.

42 La O A.A. Isolation and structure-functional characterization of human colostral lactoferrin. *Biotecnol. Aplicada*, 2000, 17:177-182.

43 Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 2009, 91:3-10.

44 Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-Lobe of Lactoferrin: The Whole Story of the Half-Molecule. Review Article. *Biochemistry Research International*, 2013, 2013(271641):1-8.

45 Hu F., Pan F., Sawano Y., Makino T., Kakehi Y., Komiyama M., Kawakami H., Tanokura M. Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: A new antianemic edible material. *Int. Dairy J.*, 2008, 18:1051-1056. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.05.003.

46 Sorensen M., Sorensen S. Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg. *The Proteins in Whey*, 1939, 83:432.

47 Moore S.A., Anderson B.F., Groom C.R., Haridas M., Baker E.N. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 274:222-236.

48 Conesa C., Sánchez L., Rota C., Pérez M.D., Calvo M., Farnaud S., Evans R.W. Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 150:131-139.

49 Okubo K., Kamiya M., Urano Y., Nishi H., Herter J.M., Mayadas T., Kurosawa M. Lactoferrin suppresses neutrophil extracellular traps release in inflammation. *E BioMedicine*, 2016, 10:204-215.

50 Iglesias-Figueroa B.F., Espinoza-Sánchez E.A., Siqueiros-Cendón T.S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International Dairy Journal*, 2019, 89:37-41.

51 Cheng J.B., Wang J.Q., Bu D.P., Liu G.L., Zhang C.G., Wei H.Y., Zhou L.Y., Wang J.Z. Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91:970-976.

52 Stelwagen K., Carpenter E., Haigh B., Hodgkinson A., Wheeler T.T. Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, 2009, 87:3-9.

53 Al-Majali A.M., Ismail Z.B., Al-Hami Y., Nour A.Y. Lactoferrin concentration in milk from camels (*Camelus dromedarius*) with and without subclinical mastitis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2007, 5:120.

54 El-Hatmi H., Girardet J., Gaillard J., Yahyaoui M.H., Attia H. Characterization of whey proteins

of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum. *Small Ruminant Research*, 2007, 70:267-271.

55 Furmanski P., Li Z.P., Fortuna M.B., Swamy C.V., Das M.R. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170:415-429.

56 Berlitti F., Pantanella F., Natalizi T., Frioni A., Paesano R., Polimeni A., Valenti P. Antiviral properties of lactoferrin- A natural immunity molecule. *Molecules*, 2011, 16:6992-7018.

57 Anghel L. Lactoferrin: analysis of the structure profile. *Chemistry Journal of Moldova*, 2014, 9:99-106.

58 Gao C.H., Dong H.L., Tai L., Gao X.M. Lactoferrin-containing immunocomplexes drive the conversion of human macrophages from M2-into M1- like phenotype. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:37.

59 Rawat P., Kumar S., Sheokand N., Raje C.I., Raje M. The multifunctional glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a novel macrophage lactoferrin receptor. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, 90:329-338.

60 Takayama Y., Aoki R., Uchida R., Tajima A., Aoki Yoshida A. Role of CXC chemokine receptor type 4 as a lactoferrin receptor. *Biochemistry and Cell Biology*, 2017, 95:57-63.

61 Valenti P., Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62:2576-2587.

62 Shin K., Wakabayashi H., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K. Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31:1605-1608.

63 Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnadal B. Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62:2560.

64 Kell D.B., Heyden E.L., Pretorius E. The Biology of Lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11:1221.

65 Milewska A., Zarebski M., Nowak P., Stozek K., Potempa J., Pyrc K. Human coronavirus NL63 utilizes heparan sulfate proteoglycans for attachment to target cells. *Journal of Virology*, 2014, 88:13221-13230.

66 Azhar J., Mohammadabadi T., Babar M.E., Hussain T. Milk Lactoferrin: A Probable Immunological Agent Against SARS-CoV-2: A Review. *Basrah Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(2):138-146.

67 Puddu P., Valenti P., Gessani S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie*, 2009, 91:11-18.

68 Britigan B.E., Lewis T.S., Waldschmidt M., McCormick M.L., Krieg A.M. Lactoferrin binds CpG-containing oligonucleotides and inhibits their immunostimulatory effects on human B cells. *The Journal of Immunology*, 2001, 167:2921-2928.

69 Legrand D., Elass E., Carpentier M., Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochemistry and Cell Biology*, 2006, 84:282-290.

70 Queiroz V.A.O., Assis A.M.O., Júnior H.C.R. Protective effect of human lactoferrin in the gastrointestinal tract. *Revista Paulista de Pediatría*, 2013, 31:90-95.

71 Ishii K., Takamura N., Shinohara M. Longterm follow-up of chronic hepatitis C patients treated with oral lactoferrin for 12 months. *Hepatology Research*, 2003, 25:226-233.

72 Embleton N.D., Berrington J.E., Chris W.M., Cummings S.S. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2013, 18:143-149.

73 Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. Across Specialty Collaboration, U. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*, 2020, 395:1033-1034.

МРНТИ: 34.27.51

А.Д. МАСИРБАЕВА^{1*}, А.Ш. САЙФУДИН¹, Б.К. АМИРАШЕВА¹, С.Д. ЖАНТЛЕСОВА¹,
М.Б. ЕРДЕНБЕКОВА¹, Ш. ТАЛАПБЕК², А.М. БАЙСАРИЕВА²

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

²Международный инженерно-технологический университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: masirbaeva.aigerim@mail.ru

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПРОБИОТИКОВ И ПРЕБИОТИКОВ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.04

Аннотация

В обзоре проанализирована целесообразность применения пробиотиков и пребиотиков. Последние годы во всем мире наблюдается повышенный интерес к пробиотикам и пребиотикам и их использованию для сохранения и поддержания здоровья, а также лечения ряда заболеваний. Исследования пробиотиков дают основания предполагать наличия у них множество положительных свойств. Наиболее часто в качестве пробиотиков используются штаммы лакто- и бифидобактерий, которые являются достаточно безопасными даже для питания детей грудного и раннего возраста. Представлены пути, посредством которых пробиотики реализуют лечебный эффект. Показано, что они эффективны при многих заболеваниях, включая острые кишечные инфекции и другие воспалительные болезни кишечника, течение аллергического процесса, расстройства иммунитета. Нормальная микрофлора человека, нормофлора, выполняет ряд важных функций в поддержании жизнедеятельности организма. Защитная функция осуществляется в первую очередь бифидо – и лактобактериями, благодаря их способности подавлять патогенные бактерии и конкурировать с ними. Одним из важнейших функций микроорганизмов нормофлоры организма человека является иммуногенная стимуляция иммунной системы. Наиболее убедительные доказательства эффективности пробиотиков связаны именно с их использованием для улучшения функционирования кишечника и влияния на иммунную систему.

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, симбиотики.

Поверхность просвета кишечника содержит триллионы живых микроорганизмов в количестве, примерно в 10 раз превышающем число клеток, из которых состоит организм взрослого человека. Основная часть их локализуется в толстом кишечнике, где обитают определенные виды бактерий. Таким образом, кишечник человека является настоящей экосистемой, необходимой для эффективного усвоения питательных веществ и поддержания генетического здоровья. Еще в 76 году нашей эры римский историк Плиний рекомендовал употреблять кисломолочные продукты для лечения гастроэнтерита. В 1908 году лауреат Нобелевской премии Илья Мечников объяснил долголетие некоторых балканских народов привычным потреблением кисломолочных продуктов, содержащих лактобациллы, которые «уменьшают токсины, вырабатываемые кишечными бактериями, укрепляют здоровье и продлевают жизнь» [1]. Одной из важнейших функций нормальной микрофлоры является колонизационная резистентность и адгезивность, что определяет ее защитные свойства. Нормальная микрофлора (биоценоз), благодаря выраженным ферментативным свойствам, способна синтезировать витамины, которые являются одним из факторов естественной защиты макроорганизма. Также доказана важная роль нормальной микрофлоры в обеспечении функции иммунных систем макроорганизма. Ухудшение состояния и состава микрофлоры приводит к появлению патологических процессов, именуемых дисбактериозами.

В начале двадцатого века было описано, что бактерия *Lactobacillus acidophilus* способна выживать в кишечнике человека. Кисломолочная ферментация растительной пищи, по-видимому, была внедрена гоминидами около 1,5 миллиона лет назад. Эта практика широко использовалась в Европе до промышленной революции и до сих пор

широко применяется различными африканскими общинами, поскольку это безопасный и простой способ сохранения продуктов питания. Потребление кисломолочных продуктов, возможно, было включено в рацион человека около 10000 лет назад. В ходе своей эволюции гоминиды адаптировали свой желудочно-кишечный тракт к более или менее высокому ежедневному потреблению живых молочнокислых бактерий. В промышленно развитых странах в течение двадцатого века перестали употреблять этот тип пищи, что, возможно, обусловило различные желудочно-кишечные и иммунологические проблемы [2]. В восьмидесятых годах была внедрена концепция, согласно которой некоторые неперевариваемые компоненты рациона могут способствовать росту определенных штаммов бактерий в кишечнике, которые связаны с благотворным воздействием на здоровье [3].

В 1917 году, еще до открытия Александром Флемингом пенициллина, германский профессор Альфред Ниссле изолировал непатогенный штамм кишечной палочки из фекалий солдата Первой мировой войны, который не вызывал развития энтероколита во время тяжелой эпидемии шигеллеза. Заболевания желудочно-кишечного тракта и ранее часто лечились жизнеспособными непатогенными бактериями для изменения или замещения кишечных микроорганизмов [4]. Бифидобактерия была впервые изолирована Анри Тиссье (Пастеровский институт) от новорожденного, получавшего грудное кормление, и названа им *Bacillus bifidus communis*. Тиссье утверждал, что бифидобактерии могут заменить протеолитические бактерии, вызывающие диарею, и рекомендовал введение бифидобактерий новорожденным, страдающим от этого синдрома [5].

Пробиотики, пребиотики, синбиотики – эти препараты применяются для лечения и профилактики состояний, связанных с нарушением микрофлоры кишечника (рисунок 1).



Рисунок 1 – Пробиотики, пребиотики, синбиотики

Термин «пробиотики» впервые был введен в 1965 г. Лилли и Стиллуэллом в противоположность антибиотикам, они были описаны как микробные факторы, стимулирующие рост других микроорганизмов. В 1989 г. Рой Фуллер подчеркнул необходимость жизнеспособности пробиотиков и выдвинул идею об их положительном действии на здоровье человека [6].

Первоначально пробиотики были определены как вещества, выделяемые микроорганизмами, стимулирующие рост других микроорганизмов (в отличие от антибиотиков). Однако в дальнейшем Всемирной Организацией Здравоохранения было дано современное определение пробиотиков, которое сохраняет свою актуальность:

«Пробиотики-это живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина» [7]. По данным Международной научной ассоциации пробиотиков и пребиотиков, спектр продуктов и препаратов, которые можно рассматривать как пробиотики, очень широк и варьирует от продуктов с пробиотиками, результаты исследований которых свидетельствуют о пользе для здоровья (например, ферментированное молоко, детские смеси), до продуктов специального медицинского назначения (например, энтеральное питание) или пробиотиков для внутреннего применения (например, вагинальные препараты). Для использования пробиотиков необходимо предварительное проведение клинических исследований на людях, с целью подтверждения их эффективного действия на конкретные штаммы нормальной микрофлоры (например, *Lactobacillus rhamnosus* GG) [8].

Ферментированные продукты, содержащие живые организмы, во многих случаях не попадают под понятие пробиотиков, если их действие специально не изучено и/или количество, которое они содержат, неизвестно. Напротив, некоторые ферментированные продукты, такие как йогурт, в отдельных случаях могут считаться пробиотиками на основании определенных специфических положительных видов действия, например, вследствие доказательств того, что они улучшают усвоение лактозы у людей с непереносимостью этого углевода; в данном случае преимущество заключается не только в меньшем содержании лактозы, но и в способности этих пробиотиков повышать активность лактазы в тонком кишечнике [9].

Фекальная трансплантация или пища с мертвыми микроорганизмами не считаются пробиотиками. Чтобы оказывать благотворное воздействие на хозяина, пробиотики не обязательно должны колонизировать орган-мишень, хотя они прибывают живыми в количестве, достаточном для воздействия на его микроэкологию и обмен веществ. Таким образом, большинство пробиотических штаммов способны достигать толстого кишечника живыми, проходя через все верхние отделы желудочно-кишечного тракта, и их жизнеспособность может зависеть от многих факторов: с одной стороны - от свойств пробиотика, с другой - от хозяина, как, например, степени кислотности в желудке, продолжительности воздействия кислоты, концентрации и продолжительности воздействия солей желчных кислот и других [10]. В качестве примера можно привести штаммы *L. casei Shirota*, *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii* или *L. acidophilus*, которые, как было установлено, безопасны и приносят пользу для здоровья человека, а также обладают высокой стабильностью в окружающей среде и устойчивы к желчным кислотам; однако только последние 3 способны прикрепляться к слизистой оболочке, и только *L. rhamnosus* GG и *L. johnsonii* вызывают колонизацию толстого кишечника [11].

Термин "пребиотик" обозначает селективно ферментированные ингредиенты, которые вызывают специфические изменения в составе и/или активности желудочно-кишечной флоры, тем самым принося пользу здоровью человека. Эта формулировка частично совпадает с определением пищевых волокон, но включает селективность пребиотиков по отношению к определенным микроорганизмам (например, прием фруктоолигосахаридов и инулина избирательно благоприятствует бифидобактериям). Особенности про- и пребиотиков представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Особенности пробиотиков и пребиотиков

Пробиотики	Пребиотики
1	2
Преимущественно непатогенные	Не перевариваются
Прикрепляются к кишечному эпителию	Углеводы с короткой цепью, служат питанием желаемой микрофлоре
Устойчивы к кислоте и желчи	Не подвергаются гидролизу в кишечнике

Продолжение таблицы 1

1	2
Восстанавливают микрофлору	Среда для ускорения роста полезной микрофлоры
Присутствие в желудочно-кишечном тракте	Способны к ферментации
Производство антимикробных соединений	Синергический эффект с пробиотиками
Стимулируют иммунную систему хозяина	Не всасываются в кишечнике
В полном объеме реализируют положительные свойства живых микроорганизмов	Не адсорбируются и не гидролизируются желудочно-кишечном тракте

Понятие "пищевые волокна" является более широким и объединяет различные углеводы и лигнин, которые устойчивы к гидролизу пищеварительными ферментами человека, но могут ферментироваться микрофлорой толстого кишечника и/или частично выводиться с калом [12]. К ним относятся некрахмалистые полисахариды (целлюлозы, гемицеллюлозы, пектины, камеди и слизи), инулин, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, устойчивый крахмал, крахмал и продукты, образующиеся в результате разложения крахмала, которые не перевариваются в организме. Некоторые из этих компонентов клетчатки строго соответствуют критериям, которые следует рассматривать как пробиотики (инулин, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, олигосахариды, полученные из сои, ксилолигосахариды, пиродекстрины и изомальтоолигосахариды). Однако некоторые вещества трудно классифицировать, например, гуаровая камедь, разновидность ферментируемой растворимой клетчатки, частично способствует росту пробиотических бактерий, но также действует как вспомогательное средство.

Измерение короткоцепочечных жирных кислот затруднено *in vivo*. Тем не менее, существуют модели *in vitro*, которые позволяют оценить их действие. Например, некоторые декстрины пшеницы при ферментации выделяют меньше газа, чем гидролизованная гуаровая камедь и инулин, что позволяет предположить, что первые могут переноситься *in vivo* лучше, чем два других волокна. Напротив, инулин, по-видимому, продуцирует значительно больше бутиратов, чем модифицированные мальтодекстрины [13, 14]. Таким образом, некоторые пробиотические волокна могут использоваться, по крайней мере теоретически, предпочтительно для лечения одних патологий по сравнению с другими в зависимости от их метаболизма в толстом кишечнике [15].

Термин «симбиотики» относится к продуктам, содержащим как пробиотики, так и пребиотики. Строго говоря, он должен быть зарезервирован для продуктов, в которых пребиотический компонент избирательно отдает предпочтение пробиотическому компоненту [16, 17, 18, 19]. Таким образом, использование пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков является многообещающей терапией.

В работе R.J. Schanler и A. Lucas доказана роль грудного молока в снижении риска некротического энтероколита у детей, рожденных ранее 29-й недели гестации, за счет колонизации кишки нормальной микрофлорой [20, 21]. Влияние *L. casei* штамма DN-114001 («Actimel», компания Данон) на уровень гуморального иммунитета (sIgA, IgA, IgG) и состав кишечной микрофлоры изучено в работе А.В. Горелова и соавт. [22]. Исследование показало, что включение пробиотического кисломолочного продукта, обогащенного *L. casei* DN-114001, в комплексную терапию детей с острой кишечной инфекцией способствовало улучшению состава кишечной микрофлоры за счет стабилизации роста лакто- и бифидобактерий и уменьшения содержания *St. aureus* и грибов рода *Candida*. При исследовании мукозального иммунитета получены данные о статистически достоверном иммуномодулирующем эффекте пробиотического штамма *L. casei* DN114001.

В настоящее время промышленность может предложить целый спектр пробиотических продуктов, содержащих бифидо- и лактобактерии - «Бифилин - М», «Ацидофилин», «Бифимикс», «Бифилюкс», «Бифидок», «Бифивит» и др. [23].

Пребиотики – это компоненты пищи, которые не перевариваются и не усваиваются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, но ферментируются микрофлорой толстого кишечника и стимулируют ее рост и жизнедеятельность. Основными видами пребиотиков являются лактулоза, дитри-, олиго-, полисахариды, пищевые волокна, аминокислоты и белки, ферменты, антиоксиданты, растительные экстракты и др. Синбиотические молочные продукты – продукты, содержащие в своем составе одновременно пробиотики и пребиотики. К данной группе можно отнести йогурты с различными фруктово-ягодными наполнителями, в состав которых входят лактобактерии, относящиеся к пробиотикам, и пищевые волокна, относящиеся к пребиотикам [24]. В настоящее время большое внимание уделяется вопросам создания пробиотических продуктов с включением в них пропионовокислых бактерий. Они обладают уникальным иммуностимулирующими и антимутагенными свойствами, они приживаются в кишечнике людей, стимулируют рост бифидобактерий и способны к снижению генотоксического действия ряда химических соединений и УФ-лучей. Положительная роль пропионовокислых бактерий обусловлена образованием ими пропионовой кислоты, минорных органических кислот, ферментов и большого количества витамина B12 [25].

Создание новых продуктов питания, относящихся к классу «здоровых» или функциональных, должно подчиняться основному правилу: «Продукт 16 должен быть вкусным и полезным одновременно» [26]. Наиболее ценными в пищевом и биологическом отношении, являются молоко и молочные продукты [27]. В современном Казахстане особый интерес среди потребителей вызывают продукты, обладающие пробиотическими, функциональными и лечебно-диетическими свойствами. Среди ингредиентов продуктов питания, оказывающих регулирующее действие на организм человека, важное место занимают пробиотические закваски, формирующие нормальную микрофлору в желудочно-кишечном тракте. Расширение ассортимента и увеличение объемов производства пробиотических продуктов на основе бифидо- и лактобактерий является актуальной проблемой и находится в центре внимания ученых и практиков ведущих институтов Казахстана, России и других стран. Все закваски для кисломолочных продуктов можно классифицировать на следующие типы: закваски из термофильных лактобактерий, используемые для получения низкожирной сметаны, творога и других кисломолочных продуктов; закваски из термофильных молочнокислых стрептококков и болгарской палочки - для йогурта, ряженки и др.; закваски для смешанного молочнокислого и спиртового брожения - для кефира, кумыса, айрана, напитка «Тан»; закваски из пробиотических микроорганизмов - для производства биокефира, напитка «Тонус», биоряженки и др. [28]. Польза молока и молочных продуктов для здоровья человека широко известна в течение тысячелетий во многих диетических культурах по всему миру. В ответ на растущий интерес потребителей к различным функциональным изделиям молочная промышленность разработала множество ферментированных молочнокислых продуктов. Высокая пищевая ценность молочных продуктов и их польза для здоровья являются результатом действия биологически активных компонентов, которые присутствуют в натуральном молоке и благодаря их подходящей модификации в процессе ферментации. Применение новых технологий имеет большое значение для сохранения существующей и формирования дополнительной пищевой ценности конечных продуктов [29]. Наиболее обширную группу продуктов функционального питания составляют молочные продукты. В настоящее время на основе молока созданы эффективные пробиотические продукты. Это связано с тем, что в молоке хорошо растет большинство микроорганизмов, участвующих в коррекции и стабилизации эндоэкологии человека. С точки зрения функционального питания наибольшую ценность представляют пробиотики, содержащие жизнеспособные микроорганизмы с высокой активностью и устойчивые к неблагоприятным факторам внешней среды.

Таким образом, адекватное использование пробиотических и пребиотических продуктов людьми разных возрастных категорий, в том числе детьми, может

способствовать оптимизации становления кишечной микрофлоры и иммунного ответа, что, безусловно, послужит профилактике различных заболеваний человека.

Литература:

- 1 Ballabriga A., Carrascosa A. Probióticos y prebióticos. En: *Nutrición en la infancia y adolescencia*. 2.^a ed. Madrid: Ediciones Ergon SA; 2001. p. 625-50.
- 2 Олескин А.В., Шендеров Б.А. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация, 2020;2(3):233–243.
- 3 Teitelbaum J.E., Walker W.A. Nutritional impact of probiotics as protective gastrointestinal organisms. *International Seminars in Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2002;22:107-38.
- 4 Perapoch J., Planes A.M., Querol A., Lopez V., Martinez-Bendayan I., Tormo R., et al. *Fungemia with Saccharomyces cerevisiae in two newborns only one of whom had been treated with ultra-levura*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19:468-70.
- 5 Montalto M., Curigliano V., Santoro L., et al. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol* 2006; 12:187–91. Pmid 16482616
- 6 O'Mahony L., McCarthy J., Kelly P., et al. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005; 128:541–51. Pmid 15765388
- 7 Gawronska A., Dziechciarz P., Horvath A., Szajewska H. A randomized double-blind placebo-controlled trial of Lactobacillus GG for abdominal pain disorders in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 177–84. Pmid 17229242
- 8 Kim H.J., Vazquez Roque M.I., Camilleri M., et al. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17:687–96. pmid 16185307 Szajewska H, Skórka A, Dylag M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25:257–64. PMID 17269987
- 9 Johnston B.C., Supina A.L., Ospina M., Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(2):CD004827. PMID 17443557
- 10 Rolfe V.E., Fortun P.J., Hawkey C.J., Bath-Hextall F. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(4):CD004826. PMID 17054217
- 11 Mallon P., McKay D., Kirk S., Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD005573. PMID 17943867
- 12 Lirussi F., Mastropasqua E., Orlando S., Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD005165. PMID 17253543
- 13 Osborn D.A., Sinn J.K. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD006475. PMID 17943912
- 14 Вялов С. С. Пробиотики при состояниях, сопровождающихся диареей. *Доктор.Ру. Гастроэнтерологи*,. 2016, 1 (118): 47–5.
- 15 Колчин В. Заполнение комнаты пробиотиками. *Sciences of Europe*. 2019, 35-2 (35).
- 16 Бояринева И.В. Пробиотики в функциональном питании. Вестник Хабаровского государственного университета экономики и права. 2020, 3 (104).
- 17 Плотникова Е.Ю., Захарова Ю.В. *Иммуномодулирующие эффекты пробиотиков*. МС. 2020. №15.
- 18 Кляритская И.Л., Мошко Ю.А., Максимова Е.В., Шелихова Е.О., Работягова Ю.С. Современные концепции применения пробиотиков в гастроэнтерологии. *Крымский терапевтический журнал*. 2021,1.
- 19 Fuller, R. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989,66: 365-378.
- 20 Schanler R.J. The use of human milk for premature infants. *Pediatr. Clin. North Am.* 2001; 48: 207–219.
- 21 Lucas A., Cole T.J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 1990; 336: 1519–1523.
- 22 Конарбаева З.К. Биотехнология получения национальных кисломолочных продуктов на основе пробиотических микроорганизмов. Докт.дис. г.Алматы, 2014.
- 23 Панова Е.В., Тошев А.Д., *Анализ ассортимента функциональных молочных продуктов, производимых предприятиями Челябинской области. Аспирант*. 2016,2: 94-96.

24 Бояринева И.В. Разработка технологии нового пробиотического кисломолочного продукт. *Перспективы науки*, 2013, 9: 26-29.

25 Диханбаева Ф.Т., Базылханова Э.Ч., Смаилова Ж.Ж. Теоретическое обоснование ингредиентов состава нового продукта из верблюжьего молока. *Вестник ВКГТУ*, 2015, 4: 81-85.

26 Диханбаева Ф.Т., Базылханова Э.Ч., Абишева А.А. Совершенствование технологии кисломолочных продуктов. *Вестник КазНИТУ имени К.И.Сатпаева*, 2016, 1:333-337

27 Диханбаева Ф.Т., Базылханова Э.Ч., Джетписбаева Б.Ш., Матибаева А.И. Роль пробиотических заквасок при производстве молочных продуктов. Матер. межд. научн.-практ. конференция «Иновационное развитие пищевой промышленности: от идеи до внедрения». Алматы, АТУ, 2016, вып.:149-150.

28 Spasenija D. Milanović, Dajana V. Hrnjez, Mirela D. Iličić, Katarina G. Kanurić, Vladimir R. Vukić, Novel Fermented Dairy Products. *Novel Food Fermentation Technologies*, 2016, 165-201

29 Просеков А.Ю. Научные основы производства продуктов питания. Лабораторный практикум.- Кемерово, 2004.

А.Д. МАСИРБАЕВА^{1*}, А.Ш. САЙФУДИН¹, Б.К. АМИРАШЕВА¹, С.Д. ЖАНТЛЕСОВА¹,
М.Б. ЕРДЕНБЕКОВА¹, Ш. ТАЛАПБЕК², А.М. БАЙСАРИЕВА²

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

²Халықаралық инженерлік-технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: masirbaeva.aigerim@mail.ru

ПРОБИОТИКТЕР МЕН ПРЕБИОТИКТЕРДІ КЛИНИКАЛЫҚ ҚОЛДАНУ

Түйін

Макалада пробиотиктердің және пребиотиктердің қолданудың орындылығын талдайды. Соңғы жылдардың бүкіл әлемде пробиотиктерге және пребиотиктерге, оларды дәнсаулықты сақтау, сондай-ақ бірқатар ауруларды емдеу үшін қолдануға қызығушылық артып келеді. Пробиотиктерді зерттеу олардың көптеген жағымдық қасиеттерінің болуын болжауға негіз береді. Көбінесе пробиотиктер ретінде лакто және бифидобактериялардың штамдары қолданылады, олар тіпті нәрестелер мен жас балаларды тамақтандыруға жеткілікті қауіпсіз. Протиктер емдік әсерін жүзеге асыратын жолдар ұсынылған. Пробиотиктер көптеген ауруларда, соның ішінде жедел ішек инфекцияларында және ішектің басқа қабыну ауруларында, аллергиялық процесстің ағымында және иммунитеттің бұзылуында тиімді екендігі көрсетілген. Адамның қалыпты микрофлорасы, нормофлора организмінің тіршілік әрекетін сақтауда бірқатар маңызды функцияларды орындауды. Корганиң функциясы, ең алдымен, патогендік бактерияларды тежеу және олармен бәсекелесу қабілетіне байланысты бифидо және лактобактериялар арқылы жүзеге асырылады. Адам ағзасының нормофлора микроорганизмдерінің маңызды функцияларының бірі иммундық жүйені иммуногендік ынталандыру болып табылады. Пробиотиктердің тиімділігінің ең күшті дәлелі оларды ішектің жұмысын жақсарту және иммундық жүйеге әсер ету үшін қолданумен байланысты.

Кілтті сөздер: пробиотиктер, пребиотиктер, симбиотиктер.

IRSTI: 34.27.51

A.D. MASSIRBAEVA^{1*}, A.S. SAIFUDIN¹, B.K. AMIRASHEVA¹, S.D. ZHANTLESSOVA¹,
M.B. YERDENBEKOVA¹, Sh. TALAPBEK², A.M. BAISARIYEVA²

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

²International University of Engineering and Technology, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: masirbaeva.aigerim@mail.ru

CLINICAL USE OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.04

Abstract

The review analyzes the feasibility of using probiotics and prebiotics. In recent years, there has been an increased interest in probiotics and prebiotics and their use for the preservation and maintenance of health, as well as the treatment of a number of diseases around the world. Studies of probiotics suggest that they have many positive properties. Most often, strains of lacto- and bifidobacteria are used as probiotics, which are safe enough even for feeding infants and young children. The ways by which probiotics implement the therapeutic effect are presented. It has been shown that they are effective in many diseases, including acute intestinal infections and other inflammatory bowel diseases, the course of the allergic process, and immune disorders. Normal human microflora, normoflora performs a number of important functions in maintaining the vital activity of the body. The protective function is carried out primarily by bifidobacteria and lactobacilli, due to their ability to suppress pathogenic bacteria and compete with them. One of the most important functions of microorganisms of the normoflora of the human body is immunogenic stimulation of the immune system. The most convincing evidence of the effectiveness of probiotics is associated with their use to improve the functioning of the intestine and influence the immune system.

Keywords: probiotics, prebiotics, symbiotics.

The surface of the intestinal lumen contains trillions of living microorganisms in an amount approximately 10 times greater than the number of cells that make up the adult human body. Most of them are localized in the large intestine, where certain types of bacteria live. Thus, the human intestine is a real ecosystem necessary for the effective assimilation of nutrients and the maintenance of genetic health. Back in 76 AD, the Roman historian Pliny recommended the use of fermented milk products for the treatment of gastroenteritis. In 1908, Nobel Prize winner Ilya Mechnikov explained the longevity of some Balkan peoples by the habitual consumption of fermented milk products containing lactobacilli, which "reduce toxins produced by intestinal bacteria, strengthen health and prolong life" [1]. One of the most important functions of normal microflora is colonization resistance and adhesion, which determines its protective properties. Normal microflora (biogenesis), due to its pronounced enzymatic properties, is able to synthesize vitamins, which are one of the factors of the natural protection of the macroorganism. The important role of normal microflora in ensuring the function of the immune systems of the macroorganism has also been proven. Deterioration of the state and composition of the microflora leads to the appearance of pathological processes called dysbiosis.

At the beginning of the twentieth century, it was described that the bacterium *Lactobacillus acidophilus* is able to survive in the human intestine. Fermented milk fermentation of plant foods, apparently, was introduced by hominids about 1.5 million years ago. This practice was widely used in Europe before the Industrial Revolution and is still widely used by various African communities, as it is a safe and easy way to preserve food. The consumption of fermented dairy products may have been included in the human diet quite recently (about 10,000 years ago). In the course of their evolution, hominids adapted their gastrointestinal tract to a more or less high daily intake of live lactic acid bacteria. In industrialized countries during the twentieth century, this type of food was stopped, which may have caused various gastrointestinal and immunological problems

[2]. In the eighties, the concept was introduced, according to which certain indigestible components of the diet can promote the growth of certain strains of bacteria in the intestine, which are associated with beneficial effects on health [3].

In 1917, even before the discovery of penicillin by Sir Alexander Fleming, German Professor Alfred Nissle isolated a non-pathogenic strain of *E. coli* from the feces of a soldier of the First World War, which did not cause the development of enterocolitis during a severe epidemic of shigellosis. Diseases of the gastrointestinal tract and previously were often treated with viable non-pathogenic bacteria to change or replace intestinal microorganisms [4]. Bifidobacteria was first isolated by Henri Tissier (Pasteur Institute) from a newborn who received breast-feeding, and was named *Bacillus bifidus communis* by him. Tissier argued that bifidobacteria can replace proteolytic bacteria that cause diarrhea, and recommended the introduction of bifidobacteria to newborns suffering from this syndrome [5].

Probiotics, prebiotics, synbiotics are used to treat and prevent conditions associated with a violation of the intestinal microflora (figure 1).

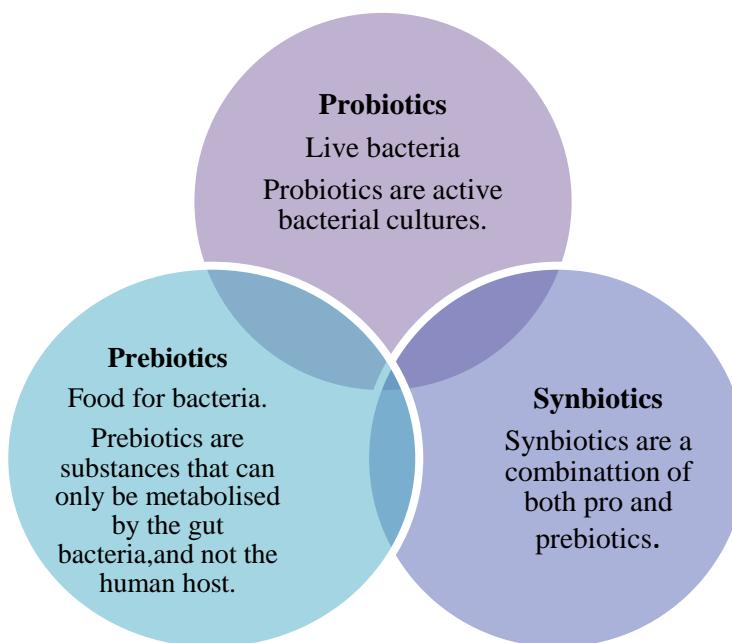


Figure 1 – Probiotics, prebiotics, synbiotics

The term "probiotics" was first introduced in 1965 by Lilly and Stillwell in contrast to antibiotics, probiotics they were described as microbial factors that stimulate the growth of other microorganisms. In 1989 Roy Fuller emphasized the need for the viability of probiotics and put forward the idea of their positive effect on human health [6].

Initially, probiotics were defined as substances secreted by microorganisms that stimulate the growth of other microorganisms (as opposed to antibiotics). However, in the future, the World Health Organization gave a modern definition of probiotics, which remains relevant: "Probiotics are living microorganisms that, when used in adequate quantities, cause an improvement in the health of the host organism" [7].

According to the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, the range of products and preparations that can be considered as probiotics is very wide and varies from products with probiotics, the results of which indicate health benefits (for example, fermented milk, infant formula), to special medical products (for example, enteral nutrition) or probiotics for oral administration (for example, vaginally). To use probiotics, preliminary clinical studies on humans are necessary in order to confirm their effective effect on specific strains of normal microflora (for example, *Lactobacillus rhamnosus GG*) [8].

Fermented foods containing living organisms, in many cases, do not fall under the concept of probiotics, if their action has not been specifically studied and /or the amount they contain is

unknown. On the contrary, some fermented foods, such as yogurt, in some cases may be considered probiotics based on certain specific positive effects, for example, due to evidence that they improve the absorption of lactose in people with intolerance to this carbohydrate; in this case, the advantage lies not only in the lower lactose content, but also in the ability of these probiotics to increase lactase activity in the small intestine [9].

Fecal transplantation or food with dead microorganisms are not considered probiotics. In order to have a beneficial effect on the host, probiotics do not necessarily have to colonize the target organ, although they arrive alive in an amount sufficient to affect its microecology and metabolism. Thus, most probiotic strains are able to reach the large intestine alive, passing through all the upper parts of the gastrointestinal tract, and their viability may depend on many factors: on the one hand - on the properties of the probiotic, on the other - on the host, such as, for example, the degree of acidity in the stomach, the duration of acid exposure, concentration and duration of exposure to bile acid salts and others [10]. As an example, the strains of *L. casei Shirota*, *L. rhamnosus GG*, *L. johnsonii* or *L. acidophilus*, which have been found to be safe and beneficial to human health, as well as highly stable in the environment and resistant to bile acids; however, only the latter 3 are able to attach to the mucous membrane, and only *L. rhamnosus GG* and *L. johnsonii* cause colonization of the colon [11].

The term "prebiotic" refers to selectively fermented ingredients that cause specific changes in the composition and/or activity of the gastrointestinal flora, thereby benefiting human health. This definition partially coincides with the definition of dietary fiber, although it adds the selectivity of probiotics in relation to certain microorganisms in particular (for example, the intake of fructooligosaccharides and inulin selectively favors bifidobacteria). Features of pro- and prebiotics are presented in Table 1.

Table 1 - Features of probiotics and prebiotics

Probiotics	Prebiotics
Non-pathogenic	Non-digestible
Intestinal epithelium adhesion	Short-chain carbohydrates, nourishes the desirable microflora
Bile and acid resistant	Not get hydrolyzed in the gut
Rejuvenates the desirable microflora	Medium for accelerating growth of beneficial microflora
Persistent presence in gastrointestinal tract	Capable to undergo fermentation
Production of antimicrobial compounds	Synergistic effect with probiotics
Stimulates the host immune system	Intestinal absorption absent
They fully realize the positive properties of living microorganisms	They are not adsorbed and are not hydrolyzed in the gastrointestinal tract

The term "dietary fiber" is broader and refers to various carbohydrates and lignin that are resistant to hydrolysis by human digestive enzymes, but can be fermented by the microflora of the large intestine and/or partially excreted with feces [12]. These include non-starchy polysaccharides (cellulose, hemicellulose, pectins, gums and mucus), inulin, fructooligosaccharides, galactooligosaccharides, resistant starch, starch and products formed as a result of starch decomposition that are not digested in the body. Some of these fiber components strictly meet the criteria that should be considered as prebiotics (inulin, fructooligosaccharides, galactooligosaccharides, oligosaccharides derived from soy, xyloligosaccharides, pyrodextrins and isomaltooligosaccharides). However, other fiber components are difficult to classify, for example, guar gum, a type of fermentable soluble fiber, partially promotes the growth of probiotic bacteria, but also acts as an auxiliary.

Measurement of short-chain fatty acids is difficult *in vivo*. Nevertheless, there are *in vitro* models that allow us to evaluate their production effect. For example, some wheat dextrans emit less gas during fermentation than hydrolyzed guar gum and inulin, which suggests that the former

can be tolerated in vivo better than the other two fibers. On the contrary, inulin seems to produce significantly more butyrate than modified maltodextrins [13, 14]. Thus, some prebiotic fibers can be used, at least theoretically, preferably for the treatment of some pathologies compared to others, depending on their metabolism in the large intestine [15].

The term "symbiotics" refers to products containing both probiotics and prebiotics. Strictly speaking, it should be reserved for products in which the probiotic component selectively gives preference to the probiotic component [16, 17, 18, 19]. Thus, the use of probiotics, prebiotics and symbiotics is a promising therapy.

The work of R.J. Schanler and A. Lucas proved the role of breast milk in reducing the risk of necrotic enterocolitis in children born earlier than the 29th week of gestation due to colonization of the intestine by normal microflora [20, 21].

The effect of *L. casei* strain DN-114001 ("Actimel", Danone company) on the level of humoral immunity (sIgA, IgA, IgG) and the composition of intestinal microflora was studied in the work of A.V. Gorelov et al. [22]. The study showed that the inclusion of a probiotic fermented milk product enriched with *L. casei* DN-114001 in the complex therapy of children with acute intestinal infection contributed to improving the composition of the intestinal microflora by stabilizing the growth of lacto- and bifidobacteria and reducing the content of *St. aureus* and *Candida* fungi. In the study of mucosal immunity, data were obtained on the statistically significant immunomodulatory effect of the probiotic strain *L. casei* DN114001.

Currently, the industry can offer a whole range of probiotic products containing bifido- and 15 lactobacilli - "Bifilin - M", "Acidophilin", "Bifimix", "Bifilux", "Bifidok", "Bifivit", etc. [23].

Prebiotics are components of food that are not digested and are not absorbed in the upper gastrointestinal tract, but are fermented by the microflora of the large intestine and stimulate its growth and vital activity. The main types of prebiotics are lactulose, ditri-, oligo-, polysaccharides, dietary fibers, amino acids and proteins, enzymes, antioxidants, plant extracts, etc. Synbiotic dairy products are products containing both probiotics and prebiotics in their composition. This group includes yogurts with various fruit and berry fillers, which include lactobacilli related to probiotics and dietary fibers related to prebiotics [24]. Currently, much attention is paid to the creation of probiotic products with the inclusion of propionic acid bacteria in them. They have unique immunostimulating and antimutagenic properties, they take root in the intestines of people, stimulate the growth of bifidobacteria and are capable of reducing the genotoxic effect of a number of chemical compounds and UV rays. The positive role of propionic acid bacteria is due to their formation of propionic acid, minor organic acids, enzymes and a large amount of vitamin B12 [25].

The creation of new food products belonging to the class of "healthy" or functional must obey the basic rule: "Product 16 should be tasty and healthy at the same time" [26]. Milk and dairy products are the most valuable in food and biological terms [27]. In modern Kazakhstan, products with probiotic, functional and therapeutic properties are of particular interest among consumers. Among the ingredients of such food products that have a regulating effect on the human body, probiotic starter cultures that form normal microflora in the gastrointestinal tract occupy an important place. Expanding the range and increasing the production of probiotic products based on bifidobacteria and lactobacilli is an urgent problem and is the focus of attention of scientists and practitioners of several leading institutes in Kazakhstan, Russia and other countries. All fermented milk products according to the composition of the starter cultures used can be classified into the following types: - starter cultures from thermophilic lactococci are used to produce low-fat sour cream, cottage cheese and other fermented milk products; - starter cultures from thermophilic lactic acid streptococci and Bulgarian sticks are used for yogurt, fermented baked milk, etc.; - starter cultures for mixed lactic acid and alcoholic fermentation are used for kefir, koumiss, ayran, drink "Tan"; - starter cultures from probiotic microorganisms are used for the production of bio-kefir, drink "Tonus", bioryazhenki, etc. [28]. The health benefits of milk and dairy products have been known for thousands of years in many dietary cultures around the world. In response to the growing consumer interest in functional products, which are part of the

challenges today, the dairy industry has developed many new functional dairy products, especially fermented dairy products. The high nutritional value and health benefits of dairy products are the result of biologically active components that are present in natural milk and due to their suitable modification during fermentation. The use of new technological processing is of great importance for the preservation of the existing and the formation of additional nutritional value of the final products [29]. The most extensive group of functional nutrition products consists of dairy products. Currently, effective probiotic products have been created on the basis of milk. This is due to the fact that most of the microorganisms involved in the correction and stabilization of human endoecology grow well in milk. From the point of view of functional nutrition, probiotics containing viable microorganisms with high activity and resistant to adverse environmental factors are of the greatest value.

Thus, the adequate use of probiotic and prebiotic products by people of different age periods, including children, can help optimize the formation of intestinal microflora and immune response, which, of course, will serve to prevent various human diseases.

References:

- 1 Ballabriga A., Carrascosa A. Probióticos y prebióticos. En: Nutrición en la infancia y adolescencia. 2.^a ed. Madrid: Ediciones Ergon SA; 2001. p. 625-50.
- 2 Oleskin A.V., SHenderov B.A. Probiotiki, psihobiotiki i metabiotiki: problemy i perspektivy. Fizicheskaya i reabilitacionnaya medicina, medicinskaya reabilitaciya, 2020;2(3):233–243.
- 3 Teitelbaum J.E., Walker W.A. Nutritional impact of probiotics as protective gastrointestinal organisms. *International Seminars in Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2002; 22:107-38.
- 4 Perapoch J., Planes A.M., Querol A., Lopez V., Martinez-Bendayan I., Tormo R., et al. *Funge-mia with Saccharomyces cerevisiae in two newborns only one of whom had been treated with ultra-levura*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19:468-70.
- 5 Montalto M., Curigliano V., Santoro L., et al. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol* 2006; 12:187–91. Pmid 16482616
- 6 O'Mahony L., McCarthy J., Kelly P., et al. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005; 128:541–51. Pmid 15765388
- 7 Gawronska A., Dziechciarz P., Horvath A., Szajewska H. A randomized double-blind placebo-controlled trial of Lactobacillus GG for abdominal pain disorders in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 177–84. Pmid 17229242
- 8 Kim H.J., Vazquez Roque M.I., Camilleri M., et al. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17:687–96. pmid 16185307 Szajewska H, Skórka A, Dylag M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25:257–64. PMID 17269987
- 9 Johnston B.C., Supina A.L., Ospina M., Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(2):CD004827. PMID 17443557
- 10 Rolfe V.E., Fortun P.J., Hawkey C.J., Bath-Hextall F. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(4):CD004826. PMID 17054217
- 11 Mallon P., McKay D., Kirk S., Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD005573. PMID 17943867
- 12 Lirussi F., Mastropasqua E., Orando S., Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD005165. PMID 17253543
- 13 Osborn D.A., Sinn J.K. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct 17;(4):CD006475. PMID 17943912
- 14 Vyalov S. S. Probiotiki pri sostoyaniyah, soprovozhdayushchihsya diareej. *Doktor.Ru. Gastroenterologii*, 2016, 1 (118): 47–5.
- 15 Kolchin V. Zapolnenie komnaty probiotikami. *Sciences of Europe*. 2019, 35-2 (35).
- 16 Boyarineva I.V. Probiotiki v funkcion'nom pitanii. *Vestnik Habarovskogo gosudarstvennogo universiteta ekonomiki i prava*. 2020, 3 (104).
- 17 Plotnikova E.YU., Zaharova YU.V. Immunomoduliruyushchie effekty probiotikov. MS. 2020. №15.

- 18 Klyaritskaya I.L., Moshko YU.A., Maksimova E.V., SHelihova E.O., Rabotyagova YU.S. Sovremennye koncepcii primeneniya probiotikov v gastroenterologii. Krymskij terapevticheskij zhurnal. 2021,1.
- 19 Fuller, R. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 1989,66: 365-378.
- 20 Schanler R.J. The use of human milk for premature infants. *Pediatr. Clin. North Am.* 2001; 48: 207–219.
- 21 Lucas A., Cole T.J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1990; 336: 1519–1523.
- 22 Konarbaeva Z.K. Biotehnologiya poluchenija nacional'nyh kislomolochnyh produktov na osnove probioticheskikh mikroorganizmov. Dokt.dis. g.Almaty, 2014.
- 23 Panova E.V., Toshev A.D. Analiz assortimenta funkcional'nyh molochnyh produktov, proizvodimyh predpriyatyiами C *Helyabinskoy oblasti. Aspirant.* 2016,2: 94-96.
- 24 Boyarineva I.V. Razrabotka tehnologii novogo probioticheskogo kislomolochnogo produkt. *Perspektivy nauki*, 2013, 9: 26-29.
- 25 Dihanbaeva F.T., Bazylhanova E.CH., Smailova ZH.ZH. Teoreticheskoe obosnovanie ingredientov sostava novogo produkta iz verblyuzh'ego moloka. *Vestnik VKGTU*, 2015, 4: 81-85.
- 26 Dihanbaeva F.T., Bazylhanova E.CH., Abisheva A.A. Sovershenstvovanie tehnologii kislomolochnyh produktov. *Vestnik KazNITU imeni K.I.Satpaeva*, 2016,1:333-337
- 27 Dihanbaeva F.T., Bazylhanova E.CH., Dzhetpisbaeva B.SH., Matibaeva A.I. Rol' probioticheskikh zakvasok pri proizvodstve molochnyh produktov. Mater. mezhd. nauchn.-prakt. konferenciya «Innovacionnoe razvitie pishchevoj promyshlennosti: ot idei do vnedreniya». Almaty, ATU, 2016, vyp.:149-150.
- 28 Spasenija D. Milanović, Dajana V. Hrnjez, Mirela D. Iličić, Katarina G. Kanurić, Vladimir R. Vukić, Novel Fermented Dairy Products. *Novel Food Fermentation Technologies*, 2016, 165-201
- 29 Prosekov A.YU. Nauchnye osnovy proizvodstva produktov pitaniya. Laboratornyj praktikum.- Kemerovo, 2004.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

IRSTI: 34.15.31, 34.25.15

I.S. KOROTETSKIY^{1*}, T.V. KUZNETSOVA¹, O.N. REVA²,
L. IVANOVA¹, N. ZUBENKO¹, R. PARENOVA¹, S.V. SHILOV¹

¹Scientific Center for Anti-Infectious Drugs, Almaty, Kazakhstan

²Centre for Bioinformatics and Computational Biology, University of Pretoria, Pretoria,
South Africa

*e-mail: laeda1@mail.ru

ANALYSIS OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DIVERSITY OF MOUSE INTESTINAL VIROME AFTER TREATMENT OF DRUG-RESISTANT PNEUMONIA WITH A COORDINATION COMPOUND

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.05

Abstract

The viral component of the gut microbiome has been poorly studied to date. Expanding knowledge about the role of the virome will make it possible to use it for therapeutic and prophylactic purposes in the future. This article shows the effect of the antibiotic drug cefazolin and the coordination compound CC-195, used for the treatment of *Staphylococcus aureus*, on the diversity of viral taxa in the intestines of mice.

The samples taken from the group of infected mice treated solely with cefazolin reflect a significant disturbance of the normal intestinal microbiota by the antibiotic therapy. The viromes of the infected mice treated with CC-195 either alone or together with cefazolin showed the closest similarity to the original virome in the negative control animals. So the coordination compound CC-195 is capable of stabilizing the intestinal virome (microflora) both when used with the antibiotic and on its own.

Keywords: Metagenome, NGS sequencing, Virome, Principal Component Analysis.

Antibiotics are now the means of first choice against bacterial infections. But along with the enormous benefits for mankind, the harm of their use is also obvious as they suppress not only the pathogens, but also the beneficial resident microflora, primarily of the intestines, reducing its population by 30% on average. Recovery of the normal resident microflora after one week of application of antibiotics, then may take from 6 months to 1 year. Also, the gut microbiome can affect the body's response to drugs by the enzymatic transformation of their structures and alter their bioavailability, bioactivity and/or toxicity [1-3].

The microflora of the digestive tract is a heterogeneous mixture of microorganisms. It includes about 1000 species of bacteria, viruses, fungi, and archaea [4]. The abundance and species diversity of microbiome varies in different parts of the intestine, reaching a maximum of 10^{10} - 10^{12} CFU/ml in the colon. The microbiome includes a complete set of microorganisms, their genes and metabolites. It contains 100 times more genes than the human genome [5]. Most of the intestinal microflora are strict anaerobes. Microorganisms colonize the intestines immediately after birth. Their composition is influenced by the genetics and nutrition of the host, the medications he or she takes, and the environment [6].

As a result of weakened immunity, the irrational use of antibiotics, chemotherapy, and defects in production of enzymes, the microbial balance is disturbed up to the disappearance of some representatives of microflora (*E. coli*, lactic acid bacteria, and bifidobacteria) and the appearance of *Candida* fungi, *Pseudomonas*, *Staphylococci*, and Protists. There appear digestive disorders, and when the immune system generalized forms of infection including sepsis may be developed by the endogenous opportunistic pathogens. Therefore, monitoring species diversity of

the microbiome, quantitative ratios of the normal and pathogenic microflora, all this is necessary for controlling adverse effects of antibiotics and restoration of the normal microflora [7]. It has also been proven that the intestinal microbiota plays a fundamental role in maintaining homeostasis not only of the intestine, but also of the body as a whole down to the gene regulation of the host. The relationships between changes in the composition of the microbiota of the gastrointestinal tract and the development of cardiovascular diseases (chronic heart failure), metabolic disorders (obesity, type II diabetes), allergic manifestations (atopic dermatitis, bronchial asthma) and autoimmune diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis, diabetes I) has been clinically proven [8-12].

Apart from bacteria, viruses are widespread in the intestinal microbiome, which are represented mainly by bacteriophages, but also by viruses of eukaryotes (those affecting eukaryotic cells, primarily human cells in the gut), as well as plant viruses entering the gastrointestinal tract (GIT) with food [13]. Viruses of eukaryotes account for about 10%. The main part of the virome from 50% to 90%, depending on the GIT section, are crAss-like phages [14]. A smaller part of phages is represented by the families *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, and *Siphoviridae*. Virome contributes significantly to the structure and functioning of the intestinal microbiota, affecting the health status of the GIT [15, 16]. Changes in the abundance of viruses in GIT can lead to chronic diseases such as Crohn's disease, ulcerative colitis and chronic recurrent inflammatory bowel diseases. The viral component of the human microbiome is understudied and poorly understood compared to the bacterial part of the microbiome [17]. A detailed research in this area will shed light on the role of phages and other viruses in the stability of microbiome and its restoration after antibiotic therapy.

Qualitative and quantitative analysis of diversity of the intestinal virome using whole-genome sequencing has an undeniable advantage over other research methods. The information obtained by metagenomic monitoring of fluctuations in abundance and composition of bacteriophages can aid in improving the control over the effectiveness and possible side effects during an antibiotic treatment of infectious diseases and drugs used for microbiome restoration. The aim of this study was to investigate whether the newly developed iodine-containing preparation CC-195 showing an activity against antibiotic resistant pathogens will also affect the virome of laboratory mice when applied solely or in combination with the antibiotic cefazolin.

Materials and methods

Sample collection. White laboratory mice of both sexes were used in this study. The animals were divided into 5 experimental groups: A) Negative control – intact animals; B) Positive control – infected and untreated animals; C) Infected animals treated with 100.0 mg/kg of CC-195; D) Infected animals treated with 25.0 mg/kg of cefazolin; E) Infected animals treated with both: CC-195 and cefazolin as described above. The mice were infected with the clinical drug-resistant strain *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022. Treatment was started after microbiological and molecular (PCR) confirmation of the infection. The drugs were administered once per day. During the joint therapy, CC-195 was first administered *per os*, and the antibiotic was administered intramuscularly after 30 minutes. The therapy was carried out for 5 days.

Whole mouse intestines were placed in 10 ml of saline solution containing 0.1% Twin 80. The intestines were washed three times with a syringe using a minimal amount of saline. The resulting suspension was centrifuged for 10 minutes at 500 g at 4°C to remove fecal masses and intestinal epithelial cells. The resulting liquid was centrifuged for 10 min at 16000 g at 4°C to obtain bacterial precipitate.

DNA Extraction. DNA samples were extracted from bacterial cells using PureLink Genomic DNA Kits (Publication Number: MAN0000601, Revision 2.0) following the manufacturer's recommendations. The integrity, size, quality and quantity of the isolated genomic DNA from bacterial strains were determined using the NanoDrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) at the optical wavelengths of 260 nm and 280 nm and by electrophoresis in 2% agarose gels.

Sequencing and Bioinformatic Analysis. An Ion Torrent PGM sequencer (Life Technologies, United States) was used for metagenomic DNA sequencing. DNA sequencing library was obtained by enzymatic method using Ion Xpress Plus Fragment Library kit (Life Technologies, USA). DNA from isolates was barcoded using an Xpress Barcode Adapters kit (Life Technologies, USA). Sequencing of the DNA library was performed on a 318 chip using the Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit. All operations were performed according to the developer's protocols. All samples were sequenced in 6 repeats.

Further processing of the DNA reads was performed using software tools as described below with default parameter settings if not indicated otherwise. The quality control of the obtained DNA fragments and trimming was performed using the UGENE v.44.0 program. [18].

DNA fragments were identified using the Kaiju program [19] using the NCBI BLAST database nr: Bacteria, Archaea, Viruses. Fragments of DNA, mouse and/or human genomes were considered contamination and excluded from the subsequent analysis. Bacterial and viral taxa were separated using an in-house script written in the Python 2.7. Further analysis was performed using DNA fragments affiliated with Viruses.

The program Past 4.02 [20] was used to calculate metagenome statistics. The following parameters were calculated:

- Depth of resolution of taxonomic diversity of metagenomic samples (rarefaction curves);
- Parameters of alpha-diversity of taxa in samples - SHE-analysis;
- Analysis of differences between metagenomic samples by principal component method (beta diversity).

The principal component analysis (PCA) is a statistical method of reducing the dimensionality of a data set by linearly transforming the data into a new coordinate system in which (most of) the variation in the data can be described with fewer measurements than the original data. To perform PCA, the absolute values of the numbers of DNA fragments identified to a particular taxon were converted to percentages of the total number. Only those taxa that were represented by at least 1% in at least one experiment were used for analysis.

A SHE analysis was performed in which the software calculated the following 3 alpha-diversity parameters: S - the natural logarithm of the detected number of species in the sample; H - the entropy of taxonomic diversity, also known as the Shannon index; and E - the natural logarithm of the proportionality index of frequencies of different taxa in the sample (evenness, $\ln(E) = H - \ln(S)$). Calculations were performed for consecutive series of sequenced metagenomic samples in order to find out whether all samples belong to the same population. This approach makes it possible to evaluate the contribution of the number of species and their equilibrium to the evolution of diversity [21].

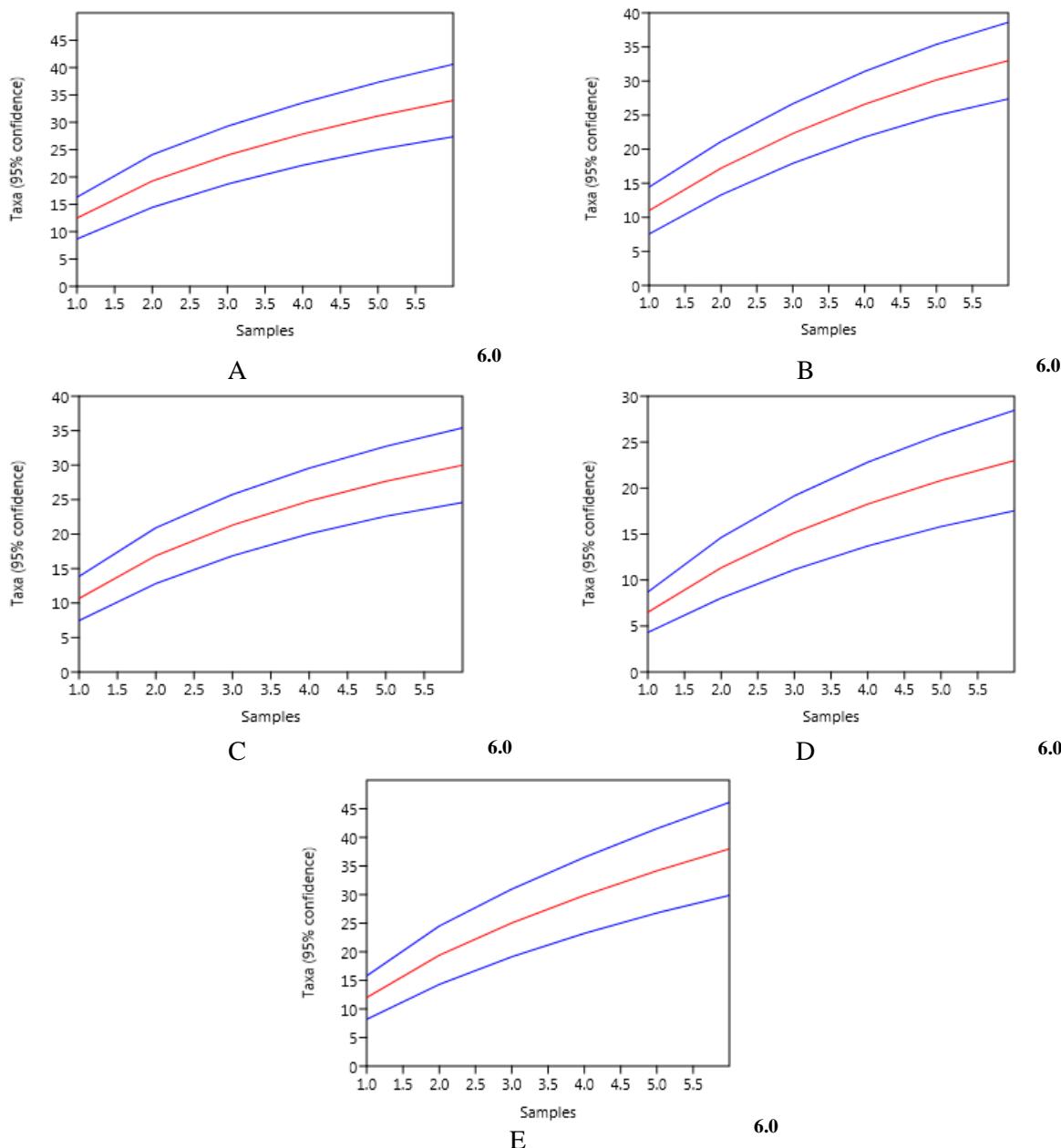
Results and Discussion

The effect of the coordination compound CC-195 on gut microbiome of laboratory mice infected with the drug-resistant (DR) strain *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022 was investigated study. Cefazolin was chosen as a model antibiotic for treating the infected mice as previously it was shown in an in vitro experiment that the strain *S. aureus* SCAID OTT1-2022 regained its sensitivity to this antibiotic under the effect of the coordination compound CC-195.

Entire mouse intestines were used to study the gut microbiome. Intestinal microbiome samples from the mice of each experimental group were sequenced in six repetitions. Quality control of the obtained DNA fragments and trimming was performed using the UGENE v.44.0.

The taxonomic identity of the filtered DNA fragments was performed using the Kaiju program. The program returns the identification results in the form of a text file specifying the identification of each individual DNA fragment to taxonomic IDs (taxid) as they are recorded in the database Taxonomy NCBI. Bacterial and viral taxa were separated using an in-house script written in the Python 2.7. DNA fragment of viral origination according to Kaiju identification were collected and analyzed.

Statistical characteristics of mouse intestinal virome. The statistical method used to estimate species richness of metagenomic samples is rarefaction analysis. The method analyzes the increase of species diversity with the increase of sample size by counting numbers of different taxa in series of experiment or by subdivision of a big sample to a series of subsets of DNA reads. The results often are represented in a form of rarefaction curves (Figure 1).



Note - A - negative control, B - positive control, C - animals treated with CC-195, D - animals treated with cefazolin, E - animals treated with cefazolin with CC-195. Red line - rarefaction curve, blue lines - 95% confidence range.

Figure 1 – Rarefaction curves calculated for five metagenomic samples

Rarefaction curves tend to rise rapidly with the increasing sample size, but then tend to reach a taxonomic saturation point when further increase of the sample size does not add any new taxonomic units. A rarefaction curve shows whether the depth of sequencing of a metagenomic sample was sufficient to recover all or the majority of species inhabiting this econiche. If the saturation point is achieved, the highest number of discovered taxa corresponds to the observed species richness. Figure 1 shows rarefaction curves estimated by program Past 4.02 for the gut

microbiome samples of laboratory mice at five different conditions, namely: A - negative control, B - positive control, C - animals treated with CC-195, D - animals treated with cefazolin, E - animals treated with cefazolin with CC-195. The program calculates the standard deviation of the observed species richness depicted by blue lines in Figure 1.

Species richness (S) predicted by the rarefaction analysis is one of the statistical parameters of alpha-diversity of metagenomic samples. Two other popular parameters are Shannon coefficient (H) representing the entropy of species diversity in a sample; and evenness (E) that calculates how uniform is the sample in term of abundance of different species. Program Past 4.02 combines these parameters in a SHE analysis on series of repeated experiments to estimate the stability of the microbiome over time or in different repetitions of the experiment. Figure 2 shows SHE curves calculated for each experimental repletion at five different conditions. The conditions are marked in the same way as in Figure 1.

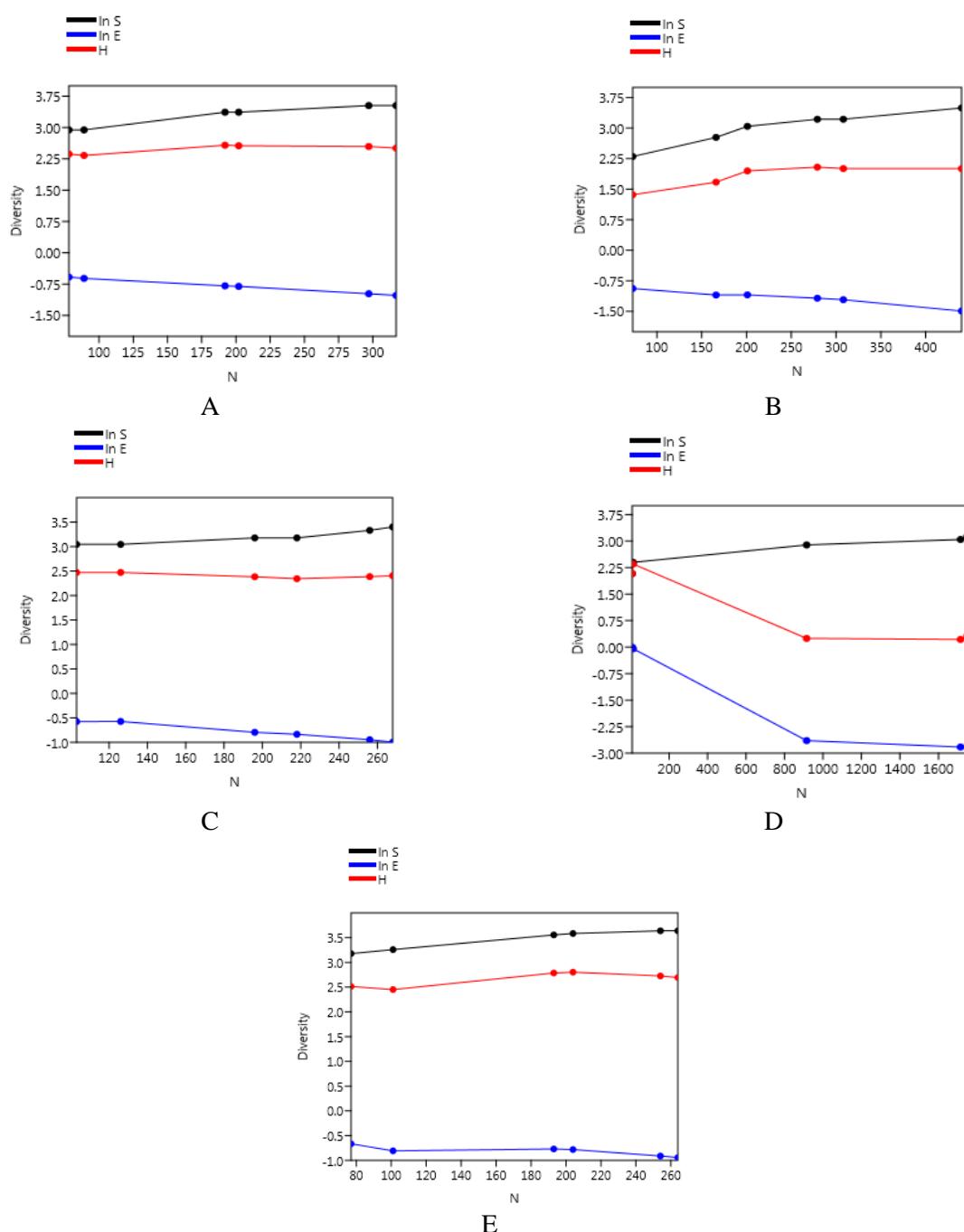
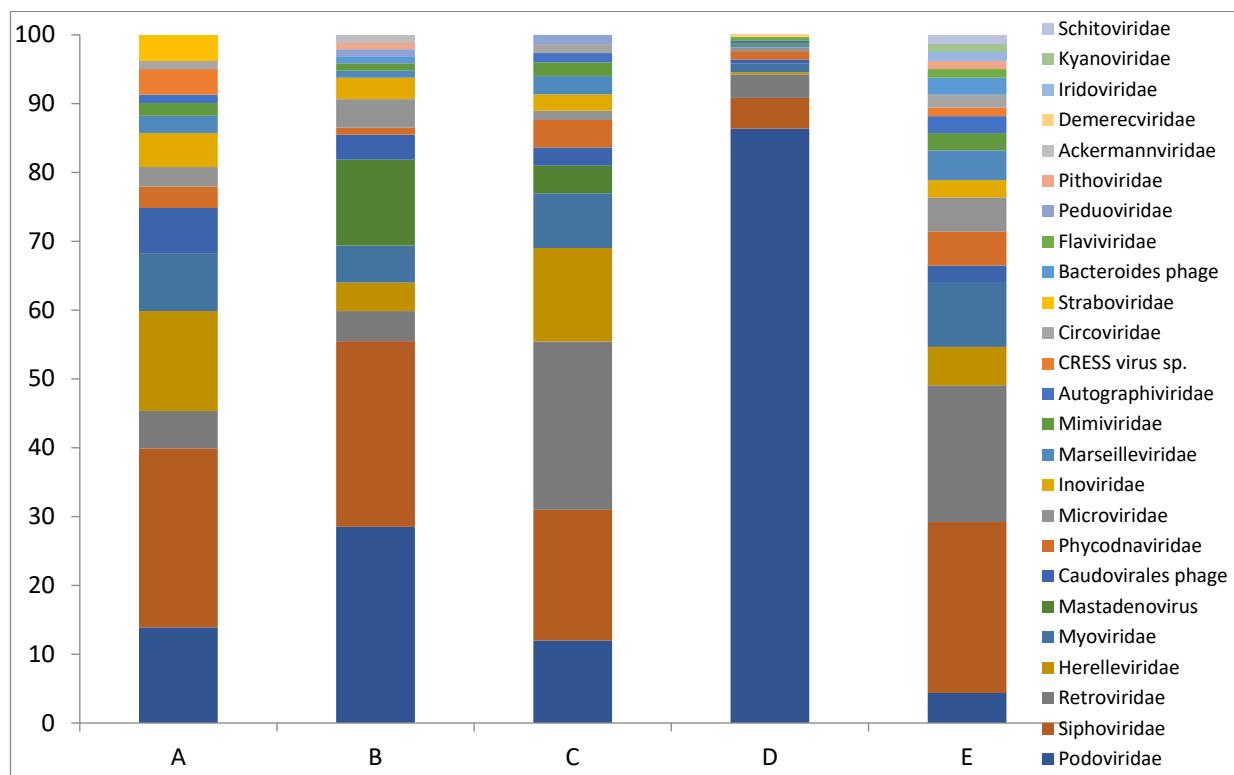


Figure 2 – SHE analysis calculated for five metagenomic samples

Let's consider statistical characteristics of viromes at different conditions. The highest taxonomic richness (around 40) was observed in the negative control and when the mice were treated with cefazolin and CC-195 (Figure 1A, E). SHE curves at these conditions (Figure 2A, E) correspond to what could be expected in the case of rich and stable microbial populations: the observed species richness (S) steadily increases with addition of the repeated experimental samples (small dots on the curves), whereas the evenness (E) steadily decreases due to discovering new rare taxonomic units in every new sample of the series; and the Shannon diversity (H) fluctuates around the average value. The statistical parameters recorded at other conditions show several specific alterations. When the mice remain untreated (Figure 1B), or treated only with cefazolin or CC-195 (Figure 1C, D), the virome taxonomic richness drops to 20-30 taxonomic units that probably reflects the reduction of the whole gut microbiome in the results of infection causing an increased immune response, and due to an antibacterial action of cefazolin. Noteworthy that the largest drop of the species richness was observed in the samples taken from the mice treated exclusively with cefazolin (Figure 1D).

The SHE analysis confirmed that the virome of the infected and untreated mice (Figure 2B) as well as the mice treated with cefazolin (Figure 2D) were the most unbalanced. The SHE parameters varied from one animal to another animal representing the individual response to the infection and the antibiotic treatment. Interestingly, in the case of treatment of the infected animals with CC-195 (Figure 2C), despite of the slight drop of the species richness, the virome remained stable in all the mice of this group.

Taxonomic diversity. An overview of viral taxonomic diversity of the samples from different experimental groups is shown in Figure 3. This analysis explains in more detail the statistical differences between the samples discussed above.



Note - The abscissa axis represents the studied groups, the ordinate axis represents the number of taxa in %. A - negative control, B - positive control, C - animals treated with CC-195, D - animals treated with cefazolin, E - animals treated with cefazolin with CC-195.

Figure 3 – Taxonomic diversity

The administration of cefazolin dramatically reduces the diversity of viruses in mice intestines compared to the negative control and the virome restored in the infected animals treated with the antibiotic and CC-195. The virome of the animals treated solely with cefazolin is reduced to two families of phages, *Podoviridae* and *Siphoviridae*, composing 90% of the virome (Figure 3). Some level of virome reduction can be observed in the infected and untreated animals, possibly due to an activation of their immune system; and to a less extent, in the infected animals treated with CC-195. In all viromes, various bacteriophages were in majority represented by different families: *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Herelleviridae*, *Microviridae* and *Myoviridae*. However, the viruses associated with eukaryotes also were abundant including retroviruses of the family *Orthoretroviridae* (a possible pathogen of mice).

Therefore, in order to identify similarity relationships between the viromes of different experimental groups, the principal component analysis (PCA) was performed (Figure 4). The studies predominantly use the first two principal components to display data in two dimensions and visually identify clusters of closely related data points [22].

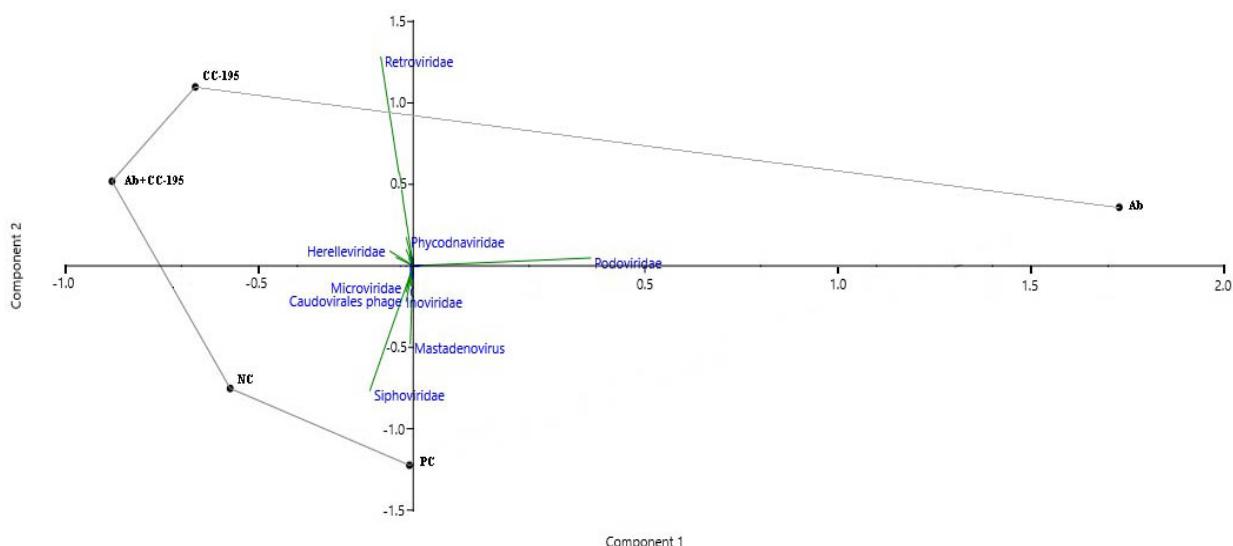


Figure 4 – Plot of principal components and contributions of frequencies of different taxa to differences between experiments

On Figure 4 it should be pointed out that the samples taken from the group of infected mice treated solely with the antibiotic were the most distant from all the other experiments that reflects a significant disturbance of the normal intestinal microbiota by the antibiotic therapy. The viromes of the infected mice treated with CC-195 either alone or together with cefazolin showed the closest similarity to each other and they also were similar to the original virome in the negative control animals and that in the infected and untreated animals (Figure 4). This indicates that the coordination compound CC-195 is capable of stabilizing the intestinal microflora both when used with the antibiotic and on its own.

Conclusion

The quantitative and qualitative composition of the virome of experimental animals after treatment with the coordination compound CC-195 and cefazolin was determined.

The biggest difference between the samples was that the use of the antibiotic apparently leads to a significant reduction of the taxonomic diversity of the bacterial microflora that in turn leads to a reduction in the diversity of the phages.

An interesting finding was that the application of the coordination compound CC-195 can stabilize the gut microflora of the infected mice and those of them treated with the antibiotic.

Funding

This study was supported by the grant BR09458960 of the program “Study of reversion of antibiotic resistance of pathogenic microorganisms for 2021-2023” provided by the Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Microbiology Laboratory (SCAID) for providing clinical isolate *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022, and the Laboratory of Pharmacology and Toxicology (SCAID) for the maintenance of animal.

References:

- 1 Patangia D., Ryan C., Dempsey E., Ross R., Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiology Open*, 2022, 11(1): e1260 (doi.org/10.1002/mbo3.1260).
- 2 Vila A.V., Collij V., Sanna S., Sinha T., Imhann F., Bourgonje A.R., Mujagic Z., Jonkers D., Masclee A., Fu J., Kurilshikov A., Wijmenga C., Zhernakova A., Weersma R. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-11 (doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z).
- 3 Wilson I., Nicholson J. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research*, 2017, 179: 204-222 (doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002).
- 4 Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burdorf K.S., Manichanh C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65 (doi.org/10.1038/nature08821).
- 5 Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124(4): 837–848 (doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017).
- 6 Ahn J., Hayes R. Environmental Influences on the Human Microbiome and Implications for Noncommunicable Disease. *Annual Review of Public Health*, 2021, 42: 277-292 (doi.org/10.1146/annurev-publhealth-012420-105020).
- 7 Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 2017, 474(11): 1823-1836 (doi.org/10.1042/BCJ20160510).
- 8 Wang L., Wang S., Zhang Q., He C., Fu C., Wei Q. The role of the gut microbiota in the health and cardiovascular diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, 3(30): 1-50 (doi.org/10.1186/s43556-022-00091-2).
- 9 Liu R., Hong J., Xu X., Feng Q., Zhang D., Gu Y. et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, 2017, 23: 859-868 (doi.org/10.1038/nm.4358).
- 10 The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 2019, 569: 641-648 (doi: 10.1038/s41586-019-1238-8).
- 11 Han P., Gu J., Li L., Wang X., Wang H., Wang Y., Chang C., Sun J. The association between intestinal bacteria and allergic diseases-cause or consequence? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11(650893): 1-22 (doi.org/10.3389/fcimb.2021.650893).
- 12 Luca F.D., Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 195(1): 71-85 (doi.org/10.1111/cei.13158).
- 13 Cao Z., Sugimura N., Burgermeister E., Ebert M.P., Zuo T., Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *The Lancet*, 2022, 81: 104-113 (doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113).
- 14 Dutilh B.E., Cassman N., McNair K., Sanchez S.E., Silva G.Z., Boling L., Barr J.J., Speth D.R., Seguritan V., Aziz R.K., Felts B., Dinsdale E.A., Mokili J.L., Edwards R.A. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature communications*, 2014, 5, 4498: 1-11 (doi.org/10.1038/ncomms5498).

- 15 Spencer L., Olawuni B., Singh P. Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12: 1-11 (doi.org/10.3389/fcimb.2022.836706).
- 16 Zhao G., Vatanen T., Droit L., Park A., Kostic A.D., Poon T.W., Vlamakis H., Siljander H., Harkonen T., Hamalainen A.M. et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: E6166-E6175 (doi.org/10.1073/pnas.1706359114).
- 17 Hillman E.T., Lu H., Yao T., Nakatsu C.H. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, 2018, 32(4): 300-313 (doi.org/10.1264/jmse2.ME17017).
- 18 Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*, 2019, 35(11): 1963-1965 (doi.org/10.1093/bioinformatics/bty901).
- 19 Menzel P., Ng K.L., Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 2016, 7: 1-9 (doi.org/10.1038/ncomms11257).
- 20 Hammer O., Harper D.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontology Electronica*, 2001, 4(1), 4: 1-9 (doi.org/palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- 21 Buzas M.A., Hayek L.C. SHE analysis for biofacies identification. *Journal of Foraminiferal Research*, 1998, 28(3): 233-239.
- 22 Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions of the royal society A*, 2016, 374: 1-16 (doi.org/10.1098/rsta.2015.0202).

И.С. КОРОТЕЦКИЙ^{1*}, Т.В. КУЗНЕЦОВА¹, О.Н. РЕВА², Л.Н. ИВАНОВА¹,
Н.В. ЗУБЕНКО¹, Р.А. ПАРЕНОВА¹, С.В. ШИЛОВ¹

¹ Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығы, Алматы, Қазақстан

² Биоинформатика және есептеу биология орталығы, Претория университеті, Претория,

Оңтүстік Африка

*e-mail: laeda1@mail.ru

ДӘРІ-ДЕРМЕКТЕРГЕ ТӨЗІМДІ ПНЕВМОНИЯНЫ КООРДИНАЦИЯЛЫҚ ҚОСЫЛЫСПЕН ЕМДЕГЕННЕҢ КЕЙІН ТЫШҚАНДАРДЫҢ ИШЕК ВИРУСЫНЫҢ САПАЛЫҚ ЖӘНЕ САНДЫҚ ӘРТҮРЛІЛІГІН ТАЛДАУ

Түйін

Осы уақытқа дейін ішек микробиомының вирустық құрылымы аз зерттелген. Виром маңыздылығы жайында білімді кеңейту болашакта оны емдік-профилактикалық мақсаттарда пайдалануга мүмкіндік береді. Бұл мақалада алтынтустес стафилококкты емдеу үшін қолданылатын цефазолин антибиотигі мен КС-195 координациялық қосылышының тышқандар ішектеріндегі вирустық тақsonдардың әртүрлілігіне әсері көрсетілген.

Тек цефазолинмен емделген ауру тышқандар тобынан алынған үлгілер антибактериялық терапия нәтижесінде қалыпты ішек микробиотасының айтарлықтай бұзылуын көрсетеді. КС-195-тің тек өзін немесе цефазолинмен бірге қабылдаған ауру тышқандардың виромдары теріс бақылау тобындағы жануарлардың бастапқы виромына ең жақын ұқсастығын көрсетті. Сонымен, КС-195 координациялық қосылышы антибиотикпен бірге қолданғанда да, өздігінен де ішек виромын (микрофлорасын) тұрақтандыруға қабілетті.

Кілтті сөздер: метагеном, NGS секвенирлеу, виром, негізгі компоненттерді талдау.

МРНТИ: 34.15.31, 34.25.15

И.С. КОРОТЕЦКИЙ^{1*}, Т.В. КУЗНЕЦОВА¹, О.Н. РЕВА², Л.Н. ИВАНОВА¹,
Н.В. ЗУБЕНКО¹, Р.А. ПАРЕНОВА¹, С.В. ШИЛОВ¹

¹ Научный центр противоинфекционных препаратов, Алматы, Казахстан

² Центр биоинформатики и вычислительной биологии, Университет Претории, Претория,
Южная Африка

*e-mail: laeda1@mail.ru

АНАЛИЗ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВИРОМА КИШЕЧНИКА МЫШЕЙ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОЙ ПНЕВМОНИИ КООРДИНАЦИОННЫМ СОЕДИНЕНИЕМ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.05

Аннотация

Вирусная составляющая кишечного микробиома на сегодняшний день мало изучена. Расширение знаний о роли вирома позволит в будущем использовать его в лечебно-профилактических целях. В этой статье показано влияние антибиотика цефазолина и координационного соединения КС-195, используемых для лечения золотистого стафилококка, на разнообразие вирусных таксонов в кишечнике мышей.

Образцы, полученные у группы инфицированных мышей, получавших только цефазолин, отражают значительное нарушение нормальной кишечной микробиоты в результате антибактериальной терапии. Виромы инфицированных мышей, получавших терапию КС-195 либо отдельно, либо вместе с цефазолином, показали сходство с исходным виромом у животных отрицательного контроля. Так, координационное соединение КС-195 способно стабилизировать кишечный виром (микрофлору) как при применении вместе с антибиотиком, так и самостоятельно.

Ключевые слова: метагеном, NGS-секвенирование, виром, анализ главных компонент.

Антибиотики на сегодняшний день являются панацеей от множества заболеваний. Но наряду с огромной пользой для человечества так же очевиден и вред от их применения. Он проявляется в агрессивном вмешательстве не только в жизнедеятельность болезнетворных микроорганизмов, но и в угнетении роста полезной микрофлоры, в первую очередь кишечника, снижая ее численность в среднем на 30%. Восстановление нормофлоры после недельного курса приема антибиотиков может составлять от 6 месяцев до 1 года. Также микробиом кишечника может повлиять на реакцию организма на лекарственное вещество путем ферментативного преобразования его структуры и изменения биодоступности, биоактивности или токсичности [1-3].

Микрофлора пищеварительного тракта представляет собой гетерогенную смесь микроорганизмов. В ее состав входит около 1000 видов бактерий, вирусов, грибов и архей [4]. Количество и видовое разнообразие микроорганизмов в различных отделах кишечника разнится, достигая максимальных показателей в толстой кишке 10^{10} - 10^{12} КОЕ/мл. Микробиом включает в себя полный набор микроорганизмов, их генов и метаболитов. Он содержит в 100 раз больше генов, чем геном человека [5]. Большинство кишечной микробиоты является строгими анаэробами. Микроорганизмы колонизируют кишечник сразу после рождения. На их состав оказывает влияние генетика и питание хозяина, принимаемые им лекарственные препараты, а также окружающая среда [6].

В результате ослабления иммунитета, нерационального применения антибиотиков, химиотерапии, дефектов в выработке ферментов нарушается микробный баланс вплоть до исчезновения некоторых представителей микрофлоры (кишечной палочки, молочнокислых и бифидобактерий) и появления грибов рода кандида, синегнойной палочки, стафилококков и протей. Появляются расстройства пищеварения, а при снижении иммунитета может

развиться генерализованная форма эндогенной инфекции вплоть до сепсиса. Поэтому, мониторинг видового разнообразия микроорганизмов, их количественного соотношения в норме и при различных патологиях, необходим для разработки различных подходов в восстановлении микробиоценоза [7]. Также доказано, что кишечная микробиота играет фундаментальную роль в поддержании гомеостаза не только кишечника, но и всего организма в целом вплоть до генетического уровня. Клинически доказана взаимосвязь изменения состава микробного профиля желудочно-кишечного тракта с развитием сердечно-сосудистых заболеваний (хроническая сердечная недостаточность), нарушениями обмена веществ (ожирение, сахарный диабет II типа), аллергическими (атопический дерматит, бронхиальная астма) и аутоиммунными заболеваниями (болезнь Крона, язвенный колит, сахарный диабет I) [8-12].

Помимо бактерий, в микробиоме кишечника широко распространены вирусы, которые представлены в основном бактериофагами, но также и вирусами эукариот (поражающими эукариотические клетки, в первую очередь клетки человека в кишечнике), а также растительными вирусами, попадающими в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) с пищей [13]. Вирусы эукариот составляют около 10%. Основную часть вирома, от 50 до 90%, в зависимости от отдела ЖКТ, составляют срAss-подобные фаги [14]. Меньшая часть фагов представлена семействами *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae*. Виром вносит значительный вклад в структуру и функционирование кишечной микробиоты, влияя на состояние здоровья ЖКТ [15, 16]. Изменения количества вирусов в ЖКТ могут привести к хроническим заболеваниям, таким как болезнь Крона, язвенный колит и хронические рецидивирующие воспалительные заболевания кишечника. Вирусный компонент микробиома человека недостаточно изучен и плохо изучен по сравнению с бактериальной частью микробиома [17]. Подробные исследования в этой области проливают свет на роль фагов и других вирусов в стабильности микробиома и его восстановлении после антибактериальной терапии.

Качественный и количественный анализ разнообразия кишечного вирома с помощью полногеномного секвенирования имеет неоспоримое преимущество перед другими методами исследования. Информация, полученная в результате метагеномного мониторинга колебаний численности и состава бактериофагов, может помочь в улучшении контроля за эффективностью и возможными побочными эффектами при лечении инфекционных заболеваний антибиотиками и препаратами для восстановления микробиома. Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы выяснить, будет ли вновь разработанный йодсодержащий препарат КС-195, обладающий активностью в отношении устойчивых к антибиотикам патогенов, также влиять на виром лабораторных мышей при применении отдельно или в комбинации с антибиотиком цефазолином.

Материалы и методы

Сбор образцов. В исследовании использовали белых лабораторных мышей обоего пола. Животные были разделены на 5 экспериментальных групп: А) Отрицательный контроль – интактные животные; Б) Положительный контроль – инфицированные и нелеченые животные; В) Инфицированным животным вводили 100,0 мг/кг КС-195; Г) Инфицированные животные, получавшие 25,0 мг/кг цефазолина; Д) Инфицированные животные, обработанные как КС-195, так и цефазолином, как описано выше. Мышей заражали лекарственно устойчивым клиническим штаммом *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022. Лечение начинали после микробиологического и молекулярного (ПЦР) подтверждения инфекции. Препараты вводили один раз в сутки. При совместной терапии, сначала вводили координационное соединение КС-195 *per os*, через 30 минут внутримышечно вводили антибиотик. Терапия проводилась в течение 5 дней.

Кишечник мыши (полностью) помещали в 10 мл физиологического раствора, содержащего 0,1% Твина 80. Кишечник трижды промывали минимальным количеством физиологического раствора. Полученную суспензию центрифугировали 10 минут при 500g

при температуре 4°C для удаления фекальных масс и клеток эпителия кишечника. Полученную надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин при 16000g при температуре 4°C для получения бактериального осадка.

Экстракция ДНК. Образцы ДНК извлекали из бактериальных клеток с использованием набора PureLink Genomic DNA Kit (номер публикации: MAN0000601, редакция 2.0) в соответствии с рекомендациями производителя. Целостность, качество и количество выделенной геномной ДНК из бактериальных штаммов определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США) при длинах волн оптического излучения 260 и 280нм и методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Секвенирование и биоинформационный анализ. Для секвенирования метагеномной ДНК использовали секвенатор Ion Torrent PGM (Life Technologies, США). ДНК библиотеку получали ферментативным методом с использованием набора Ion Xpress Plus Fragment Library (Life Technologies, США). Баркодирование ДНК проводили с помощью набора Xpress Barcode Adapters (Life Technologies, США). Секвенирование библиотеки ДНК осуществляли на чипе 318 с использованием набора для секвенирования Ion PGM Hi-Q View. Все операции проводились согласно протоколам разработчика. Все образцы были секвенированы в 6 повторах.

Дальнейшую обработку полученных ридов ДНК проводили с использованием программ, с настройками параметров по умолчанию, если не указано иное. Контроль качества полученных фрагментов ДНК и тримминг проводили с помощью программы UGENE v.44.0. [18].

Фрагменты ДНК идентифицировали с помощью программы Kaiju [19] по базе данных NCBI BLAST nr: Bacteria, Archaea, Viruses. Фрагменты ДНК, мышного и/или человеческого геномов считались загрязнением и исключались из последующего анализа. Разделение бактериальных и вирусных таксонов осуществлялось при помощи собственного скрипта, написанного на языке программирования Python 2.7. Дальнейший анализ проводился по фрагментам, идентифицированным как таксон Viruses.

Для вычисления статистических данных метагеномов использовалась программа Past 4.02 [20]. Вычислялись следующие параметры:

- Глубина разрешения таксономического разнообразия метагеномных образцов (кривые разрежения);
- Параметры альфа-разнообразия таксонов в образцах - SHE-анализ;
- Анализ отличий между метагеномными образцами методом главных компонент (бета-разнообразие).

Метод главных компонент (PCA) — это статистический метод уменьшения размерности набора данных путем линейного преобразования данных в новую систему координат, в которой (большую часть) вариации данных можно описать с меньшим количеством измерений, чем исходные данные. Для проведения PCA абсолютные значения числа фрагментов ДНК, идентифицированных до определенного таксона, были преобразованы в проценты от общего числа. Для анализа использовались только те таксоны, которые были представлены не менее 1% хотя бы в одном эксперименте [21].

Был проведен SHE-анализ, в ходе которого программа рассчитала следующие 3 параметра альфа-разнообразия: S - натуральный логарифм обнаруженного количества видов в образце; H - энтропия таксономического разнообразия, известная также как индекс Шеннона; E - натуральный логарифм показателя пропорциональности частот различных таксонов в выборке (равномерность, $\ln(E) = H - \ln(S)$). Расчеты проводились для последовательных серий секвенированных метагеномных образцов, чтобы выяснить, принадлежат ли все образцы к одной и той же популяции. Такой подход позволяет оценить вклад числа видов и их равновесия в эволюцию разнообразия.

Результаты и обсуждение

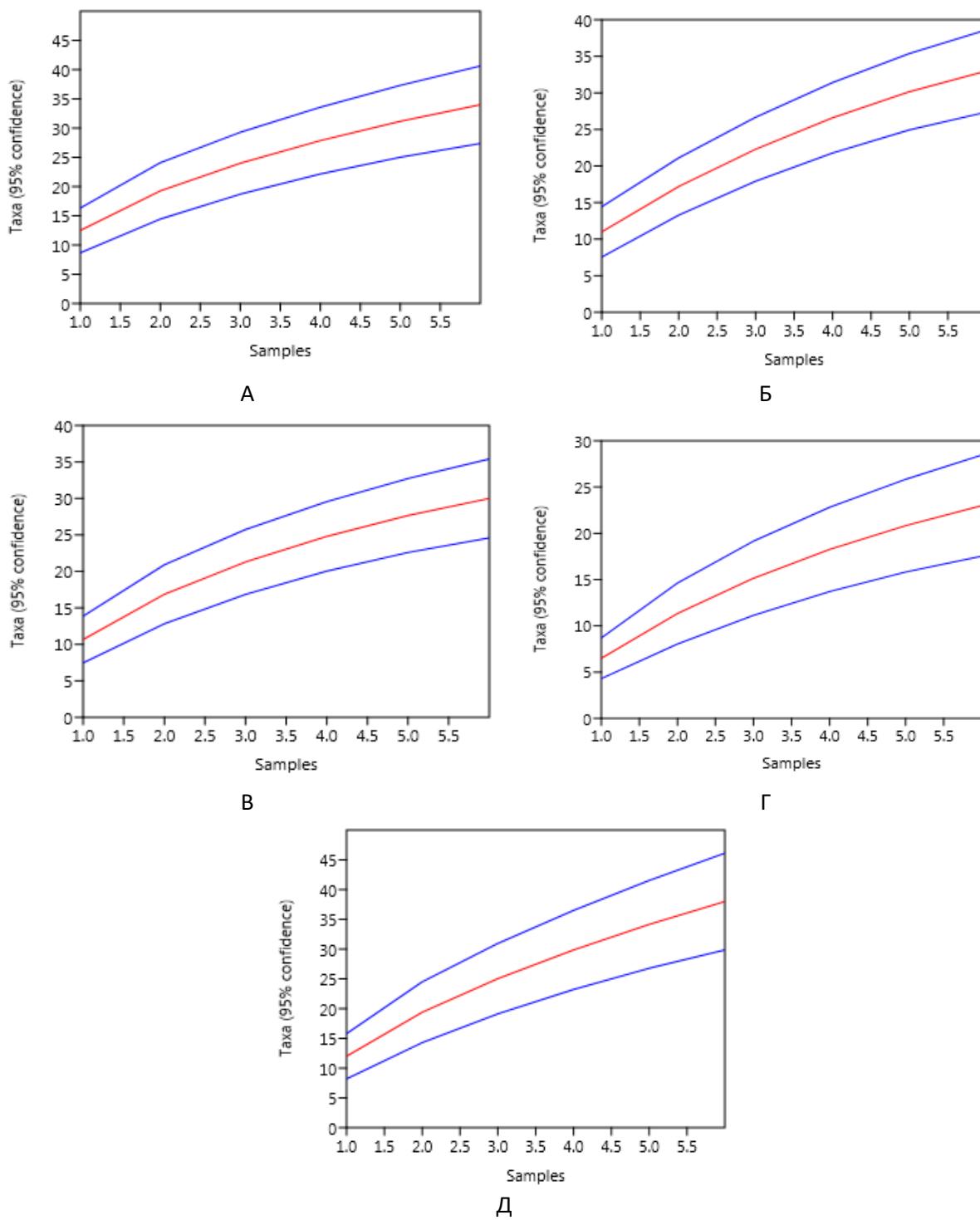
Исследовано влияние координационного соединения КС-195 на микробиом кишечника лабораторных мышей, инфицированных лекарственно-устойчивым (ЛУ) штаммом *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022. В качестве модельного антибиотика для лечения инфицированных мышей был выбран цефазолин, так как ранее в эксперименте *in vitro* было показано восстановление чувствительности штамма *S. aureus* SCAID OTT1-2022 к этому антибиотику под действием координационного соединения КС-195.

Для изучения микробиома кишечника использовали цельный кишечник мышей. Образцы кишечного микробиома мышей каждой экспериментальной группы секвенировали в шести повторах. Контроль качества полученных фрагментов ДНК и обрезку проводили с помощью программы UGENE v.44.0.

Таксономическую принадлежность отфильтрованных фрагментов ДНК проводили с помощью программы Kaiji. Программа возвращает результаты идентификации в виде текстового файла с указанием идентификации каждого отдельного фрагмента ДНК по таксономическим идентификаторам (taxid) по мере их регистрации в базе данных Taxonomu NCBI. Бактериальные и вирусные таксоны были разделены с помощью собственного скрипта, написанного на Python 2.7. Дальнейший анализ проводился по фрагментам идентифицированных и отсортированных как Viruses.

Статистические характеристики вириома кишечника мышей. Статистический метод, используемый для оценки видового богатства по результатам отбора проб, называется рарефикацией. Метод позволяет анализировать увеличение видового разнообразия с увеличением размера выборки путем подсчета количества различных таксонов в серии экспериментов или путем разделения большой выборки на серию подмножеств прочтений ДНК. Результаты часто представлены в виде рарефикационных кривых (рисунок 1). Рарефикационные кривые имеют тенденцию к быстрому росту с увеличением размера выборки, но затем происходит достижение точки таксономического насыщения, когда дальнейшее увеличение размера выборки не добавляет никаких новых таксономических единиц. Рарефикационная кривая показывает, была ли глубина секвенирования метагеномной выборки достаточной для восстановления всех или большинства видов, населяющих эту экологическую нишу. При достижении точки насыщения наибольшее количество обнаруженных таксонов соответствует наблюдаемому видовому богатству. На рисунке 1 представлены рарефикационные кривые, рассчитанные для образцов кишечного микробиома лабораторных мышей в пяти различных условиях, а именно: А — отрицательный контроль, Б — положительный контроль, В — животные, получавшие КС-195, Г — животные, получавшие цефазолин, Д - животные, получавшие цефазолин с КС-195. Метод также вычисляет стандартное отклонение наблюдаемого видового богатства, показанного синими линиями на рисунке 1.

Видовое богатство (S), прогнозируемое с помощью рарефикационного анализа, является одним из статистических параметров альфа-разнообразия метагеномных выборок. Двумя другими популярными параметрами являются коэффициент Шеннона (H), представляющий энтропию видового разнообразия в образце; и равномерность (E), которая рассчитывает, насколько однородна выборка с точки зрения обилия различных видов. Программа Past 4.02 объединяет эти параметры в SHE-анализе серии повторных экспериментов для оценки стабильности микробиома во времени или в разных повторах эксперимента. На рисунке 2 показаны кривые SHE, рассчитанные для шести повторов при пяти различных условиях. Условия обозначены так же, как на рисунке 1.



Примечание - А - отрицательный контроль, Б - положительный контроль, В - животные, получавшие КС-195, Г - животные, получавшие цефазолин, Д - животные, получавшие цефазолин с КС-195. Красная линия – рарефикационная кривая, синие линии – доверительный интервал 95%.

Рисунок 1 – Рарефикационные кривые, рассчитанные для пяти метагеномных образцов

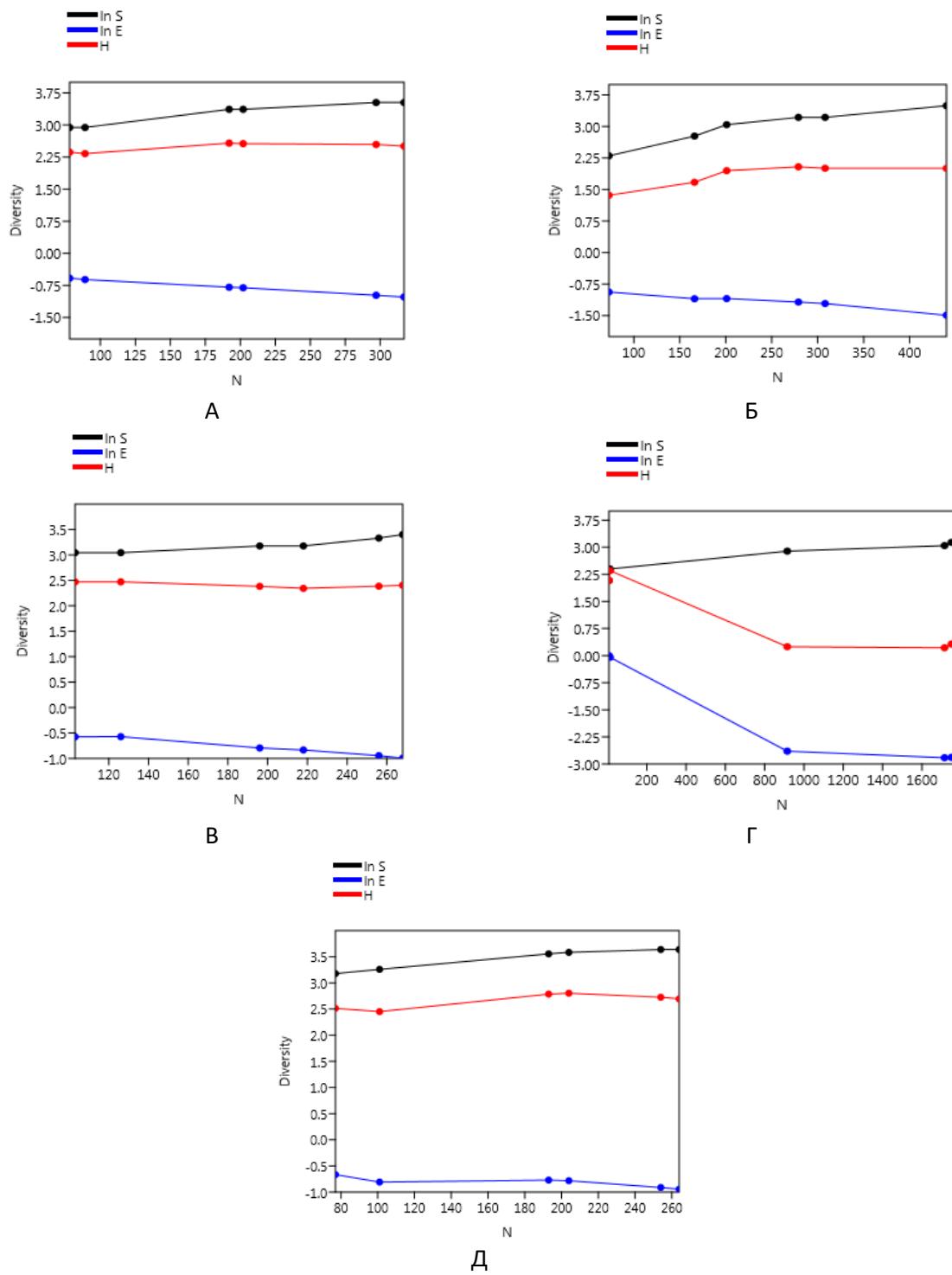


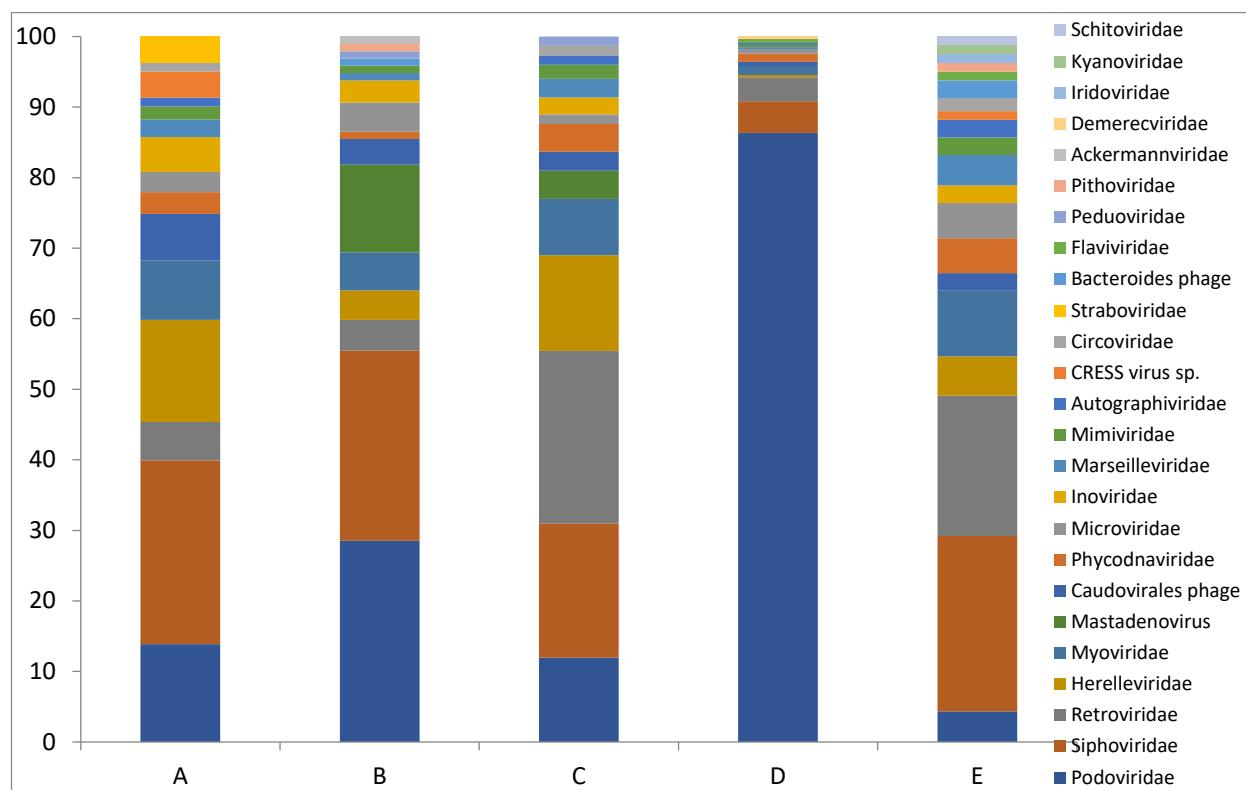
Рисунок 2 – SHE-анализ, рассчитанный для пяти метагеномных образцов

Рассмотрим статистические характеристики виромов в разных условиях. Наибольшее таксономическое разнообразие (около 40) наблюдалось в отрицательном контроле и в группе при комплексном лечении мышей цефазолином и КС-195 (рисунок 1А, Д). Кривые SHE в этих условиях (рисунок 2А, Д) соответствуют тому, что можно было бы ожидать в случае богатых и стабильных микробных популяций: наблюдаемое видовое богатство (S) неуклонно увеличивается с добавлением повторных экспериментальных образцов (маленькие точки на кривых), тогда как выравненность (E) неуклонно снижается за счет обнаружения новых редких таксономических единиц в каждой новой выборке серии; а разнообразие Шеннона (H) колеблется вокруг среднего значения. Статистические параметры, полученные в других экспериментальных группах, показывают несколько

специфических изменений. Когда мыши остаются без лечения (рисунок 1Б) или получают только цефазолин или КС-195 (рисунок 1В, 1Г), таксономическое богатство вирома падает до 20-30 таксономических единиц, что, вероятно, отражает снижение микробиома всего кишечника в результате инфекции, вызывающей повышенный иммунный ответ, и за счет антибактериального действия цефазолина. Примечательно, что наибольшее падение видового разнообразия наблюдалось в образцах, взятых у мышей, получавших исключительно антибиотик цефазолин (рисунок 1Г).

SHE-анализ подтвердил, что виром инфицированных и нелеченых мышей (рисунок 2Б), а также мышей, получавших только цефазолин (рисунок 2Г), был наиболее несбалансированным. Параметры SHE варьировались от одного животного к другому, отражая индивидуальную реакцию на инфекцию и лечение антибиотиком. Интересно, что в случае лечения инфицированных животных координационным соединением КС-195 (рисунок 2Б), несмотря на небольшое падение видового богатства, виром оставался стабильным у всех мышей этой группы.

Таксономическое разнообразие. Обзор вирусного таксономического разнообразия образцов из разных экспериментальных групп показан на рисунке 3. Этот анализ более подробно объясняет статистические различия между образцами, обсуждавшимися выше.



Примечание - По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат - количество таксонов в %. А - отрицательный контроль, Б - положительный контроль, В - животные, получавшие КС-195, Г - животные, получавшие цефазолин, Д - животные, получавшие цефазолин с КС-195.

Рисунок 3 - Таксономическое разнообразие

Использование только цефазолина резко снижает разнообразие вирусов в кишечнике мышей по сравнению с отрицательным контролем и восстановленным виром у животных, получавших комбинированную терапию антибиотиком и КС-195. Виромы животных, получавших только цефазолин, редуцированы до двух семейств фагов, *Podoviridae* и *Siphoviridae*, составляющих 90% вирома (рисунок 3). Небольшой уровень снижения вирома наблюдается у инфицированных и нелеченых животных, возможно, за

счет активации их иммунной системы; и в меньшей степени - у инфицированных животных, получавших в качестве терапии координационное соединение КС-195. Во всех виринах различные бактериофаги были преимущественно представлены семействами: *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Herelleviridae*, *Microviridae* и *Myoviridae*. Вирусы, связанные с эукариотами, также были многочисленны, включая ретровирусы семейства *Orthoretroviridae* (возможный возбудитель мышей).

Поэтому, чтобы выявить отношения сходства между виromами разных экспериментальных групп, был проведен анализ главных компонент (рисунок 4). В исследованиях преимущественно используются первые два основных компонента для отображения данных в двух измерениях и визуального определения кластеров тесно связанных точек данных [22].

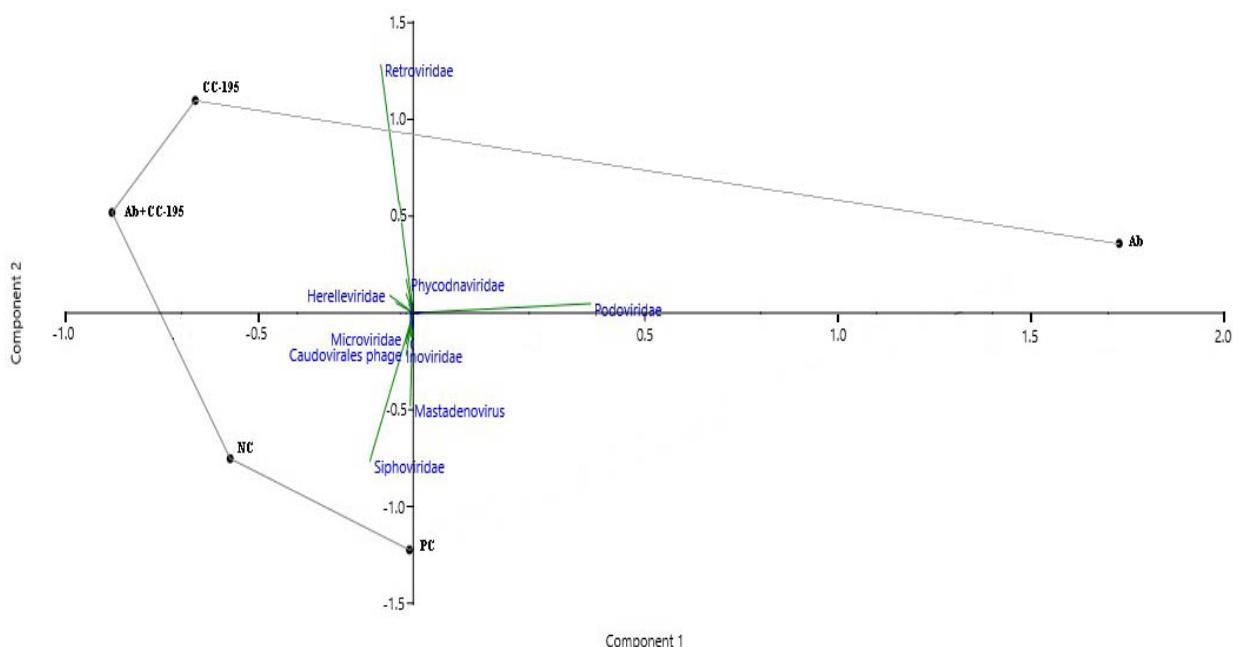


Рисунок 4 - График главных компонент и вклад частот разных таксонов в различия между группами

Следует отметить, что образцы, взятые из группы инфицированных мышей, получавших только антибиотик, оказались наиболее удаленными от всех остальных экспериментов, что отражает значительное нарушение нормальной кишечной микробиоты при антибактериальной терапии. Вирины инфицированных мышей, получавших КС-195 отдельно или вместе с цефазолином, показали наибольшее сходство друг с другом, а также были сходны с исходным виромом у животных отрицательного контроля, а также у инфицированных и нелеченых животных (рисунок 4). Это свидетельствует о том, что координационное соединение КС-195 способно стабилизировать кишечную микрофлору как при применении с антибиотиком, так и самостоятельно.

Заключение

Определен количественный и качественный состав вирина экспериментальных животных после терапии координационным соединением КС-195 и цефазолином.

Самое большое различие между образцами заключалось в том, что применение антибиотика, по-видимому, приводит к значительному снижению таксономического разнообразия бактериальной микрофлоры, что, в свою очередь, приводит к уменьшению разнообразия фагов.

Интересным открытием стало то, что применение координационного соединения КС-195 может стабилизировать микрофлору кишечника инфицированных мышей и мышей, получавших антибиотик.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта BR09458960 программы «Исследование реверсии антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов на 2021–2023 годы» Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам Лаборатории микробиологии АО НЦПП за предоставление клинического изолята *Staphylococcus aureus* SCAID OTT1-2022 и сотрудникам Лаборатории фармакологии и токсикологии АО НЦПП за содержание животных.

Литература:

- 1 Patangia D., Ryan C., Dempsey E., Ross R., Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiology Open*, 2022, 11(1): e1260 (doi.org/10.1002/mbo3.1260).
- 2 Vila A.V., Collij V., Sanna S., Sinha T., Imhann F., Bourgonje A.R., Mujagic Z., Jonkers D., Masclee A., Fu J., Kurilshikov A., Wijmenga C., Zhernakova A., Weersma R. Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nature Communications*, 2020, 11: 1-11 (doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z).
- 3 Wilson I., Nicholson J. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Translational Research*, 2017, 179: 204-222 (doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002).
- 4 Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burdorf K.S., Manichanh C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65 (doi.org/10.1038/nature08821).
- 5 Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006, 124(4): 837–848 (doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017).
- 6 Ahn J., Hayes R. Environmental Influences on the Human Microbiome and Implications for Noncommunicable Disease. *Annual Review of Public Health*, 2021, 42: 277-292 (doi.org/10.1146/annurev-publhealth-012420-105020).
- 7 Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 2017, 474(11): 1823-1836 (doi.org/10.1042/BCJ20160510).
- 8 Wang L., Wang S., Zhang Q., He C., Fu C., Wei Q. The role of the gut microbiota in the health and cardiovascular diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, 3(30): 1-50 (doi.org/10.1186/s43556-022-00091-2).
- 9 Liu R., Hong J., Xu X., Feng Q., Zhang D., Gu Y. et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, 2017, 23: 859-868 (doi.org/10.1038/nm.4358).
- 10 The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 2019, 569: 641-648 (doi: 10.1038/s41586-019-1238-8).
- 11 Han P., Gu J., Li L., Wang X., Wang H., Wang Y., Chang C., Sun J. The association between intestinal bacteria and allergic diseases—cause or consequence? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11(650893): 1-22 (doi.org/10.3389/fcimb.2021.650893).
- 12 Luca F.D., Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical & Experimental Immunology*, 2019, 195(1): 71-85 (doi.org/10.1111/cei.13158).
- 13 Cao Z., Sugimura N., Burgermeister E., Ebert M.P., Zuo T., Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *The Lancet*, 2022, 81: 104-113 (doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113).
- 14 Dutilh B.E., Cassman N., McNair K., Sanchez S.E., Silva G.Z., Boling L., Barr J.J., Speth D.R., Seguritan V., Aziz R.K., Felts B., Dinsdale E.A., Mokili J.L., Edwards R.A. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature communications*, 2014, 5, 4498: 1-11 (doi.org/10.1038/ncomms5498).

- 15 Spencer L., Olawuni B., Singh P. Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12: 1-11 (doi.org/10.3389/fcimb.2022.836706).
- 16 Zhao G., Vatanen T., Droit L., Park A., Kostic A.D., Poon T.W., Vlamakis H., Siljander H., Harkonen T., Hamalainen A.M. et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114: E6166-E6175 (doi.org/10.1073/pnas.1706359114).
- 17 Hillman E.T., Lu H., Yao T., Nakatsu C.H. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and Environments*, 2018, 32(4): 300-313 (doi.org/10.1264/jsme2.ME17017).
- 18 Rose R., Golosova O., Sukhomlinov D., Tiunov A., Prosperi M. Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*, 2019, 35(11): 1963-1965 (doi.org/10.1093/bioinformatics/bty901).
- 19 Menzel P., Ng K.L., Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 2016, 7: 1-9 (doi.org/10.1038/ncomms11257).
- 20 Hammer O., Harper D.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, 4(1), 4: 1-9 (doi.org/palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- 21 Buzas M.A., Hayek L.C. SHE analysis for biofacies identification. *Journal of Foraminiferal Research*, 1998, 28(3): 233-239.
- 22 Jolliffe I.T., Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions of the royal society A*, 2016, 374: 1-16 (doi.org/10.1098/rsta.2015.0202).

FTAMP: 34.27.05

Г.Ж. ЕЦАНОВА*, Н.А. УТАРБАЕВА, А.К. КАЛИЕВА,
Б. БАҚЫТЖАНҚЫЗЫ, Н.А. КЕМАЛОВА

Қ.Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік университеті, Актөбе, Қазақстан
*e-mail: bakshagul.94@mail.ru

КАЛИФОРНИЯЛЫҚ ШЫЛАУШЫН *EISENIA FOETIDA* ҚӨМЕГІМЕН БИОГУМУС ӨНДІРУ ЖӘНЕ ОНЫ ЕГІНШІЛІКТЕ ҚОЛДАНУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.06

Түйін

Макалада калифорниялық шылаушын *Eisenia foetida* қомегімен органикалық қалдықтардан биогумус өндіру технологиясы бойынша тәжірибелік зерттеулер жүргізіліп, оны қияр көшеттерін өсіруде пайдаланудың ерекшеліктері туралы дәлелдер келтірілген. Калифорниялық шылаушындар тәжірибелік зерттеу барысында 4,5 ай ішінде ірі қара малдардың көңінен таза биогумус өндіріп шығарды. Шылаушындарды субстратқа жіберілгенен кейін 21 күнде белсенділігі артып, құрттардың жұмыс жасау қабілетінің және көбею процесінің артқандығын көрсетті. Әсіресе 7000 құрт жіберілген жәшіктердегі ылғалдылықты 45-65 %-да тұрақты сақтағанда, биогумустың 4,5 айда дайын болғаны анықталды. Алынған биогумус тыңайтқышы қияр көшеттеріне қолданылып, ол өсімдіктердің биіктігіне, жапырақтарының санына, ауданына, вегетативтік салмағына оң әсер көрсеткені анықталды.

Кілтті сөздер: биогумус, калифорниялық шылаушын, органикалық тыңайтқыштар, қияр көшеттері, вермикомпост.

Республикамызда жыл сайын егін егіп, бау-бақша өсірушілер саны артып келеді. Шаруалардың егіншілікten мол өнім алуы үшін түрлі тыңайтқыштар қажет. Минералды тыңайтқыштардың көпшілігі егіннің сапасы мен көлемін жақсартуға қабілетті табиғи құралдардың орнын алмастыра алмайды. Алайда олардың орнын баса алатын органикалық тыңайтқыштар – биогумустың алатын орны ерекше. Қазіргі таңда елімізде аталмыш тыңайтқыштарды өте қарапайым жағдайда өндіру дамып келуде. Әсіресе, жануарлар қалдықтарынан алынған көңге калифорниялық қызыл шылаушандарды жіберіп, коректендіру арқылы құнарлы қарашірікке айналдыру ең тиімді және арзан тыңайтқыш – биогумус алуда қолданылады. Осылай өнделген биоорганикалық тыңайтқыштың тиімділігі - өзге тыңайтқыштармен салыстырғанда өнімділікті 7-8 есеге дейін артық береді [1].

Биогумус өндеудегі пайдаланған калифорниялық қызыл шылаушындарға қызығушылық алғаш Америка Құрама Штаттарында 20 ғасырдың 50-ші жылдарында дами бастады. Аталмыш құрт американдық Thomas J.Barrett тарапынан 1959 жылы Калифорния штатында түрлі жауынқұрттарын будандастыру нәтижесінде алынған.

Калифорниялық қызыл құрт кәдімгі жауынқұрттымен салыстырғанда анағұрлым белсендірек, көбеюі тез, ұзағырақ өмір сүреді (кәдімгі құртпен салыстырғанда 15 жылға дейін) және субстратты көбірек өндейді. Бұл құртты өсіру үшін көбірек жылу, ылғалдылық және субстрат қажет. Субстраттың құрамы негізінен ауылшаруашылық жануарларының нәжісі, өсімдік қалдықтары және де басқа өндірістік органикалық қалдықтары болуы мүмкін [2].

Калифорниялық қызыл құрттың ұзындығы 10 см, диаметрі 3-5 мм, дене салмағы шамамен 1 г-ды құрайды. Кәдімгі жауынқұрттына қарағанда 150 есе тез көбейеді [1]. 21 күнде жана ұрпақ пайда болады, ал 90-120 күнде ересек күйге өтеді. Екі шұбалашаңың ұрпағы жылына 1,5 мыңға дейін жетеді (сурет 1).



Сурет 1 - Калифорниялық шылаушын

Калифорниялық құрттар мал шаруашылық қалдықтары - органикалық көнді тез және өсімдік қалдықтарын тиімді қайта өңдеудің керемет қабілетіне ие болатын вермикомпост жасайды. Бұл бірегей тыңайтқыш, оның құрамы кәдімгі қараширікпен салыстырғанда анағұрлым жоғары. Биогумустың іісі жоқ, сондықтан оны тек бақшада ғана емес, сонымен қатар жылжайларда өсімдіктерді коректендіру үшін де қолдануға ұсынылады. Көбінесе мұндай қурделі тыңайтқышты қектемде топыраққа қолданылады. Әсіресе, оны қектемгі көшет дайындауда маңызды тыңайтқыш ретінде топыраққа енгізген тиімдірек [3].

Кәдімгі жауынқұрт пен калифорния құрттардың арасында айтарлықай айырмашылық жоқ. Дегенмен, калифорниялық құрттар органикалық заттарды өңдеуде тиімдірек болып келеді. Қызыл құрттар жылы ортаны жақсы көреді және аязға шыдай алмайды. Кәдімгі жауынқұртынан айырмашылығы, калифорния шылаушындары жаңбыр кезінде жер бетіне шықпай, жерде (субстратта) қалуға бейімделген. Құрттарды өсіру үшін ең жақсы жер-компост шұңқыры (немесе үйінді) және ағаш жәшіктерді пайдаланады. Негізгі қоректену азығы ретінде көң, құс саңғырығы, сабан, кураган шөптер, көкөніс қабықтары және басқа да органикалық қалдықтарды қолданылады. Биогумусты дайындау барысында органикалық қалдықтарды жақсылап араластырып, ылғалданырады. 4,5 айдан кейін органикалық заттар толық ыдырап, өсімдік өсіру үшін жақсы тыңайтқыш - биогумусқа айналады. Биогумус дайындауға арналған ыдыстың тәменгі бөлігі міндетті түрде ылғалдың өтуіне мүмкіндік беруі керек. Қоспа ретінде қараширік, кураган өсімдік қалдықтары және органикалық мал аруашылығының қалдықтарды пайдалануға болады. Олар құрттың тіршілік ету ортасының жайлышығын, жұмсақтығын және қоректенуін тудырады. Органикалық заттардың қалыпты ыдырауы үшін қоспаны оттегімен қамтамасыз ете отырып, аптасына бір рет субстратты ақырын араластыру керек. Калифорниялық шылаушындар арналған субстраттарда қышқылдықтың, ылғалдылықтың және температуралың қажетті параметрлеріне сәйкес келуі керек [4].

Қазіргі танда Республикасында калифорниялық шылаушындарды өсіру жақсы жолға қойыла бастады. Қызыл калифорния құртын өсірудің мақсаты ауылшаруашылығына қажетті органикалық тыңайтқыш - биогумусты өндіру, оны егіншілікте пайдаланып, өнімділігін арттырып, сапалы, таза өнім алу болып табылады. Сонымен қатар, мал шаруашылығының қалдықтарын тиімді пайдалану нәтижесінде қоршаған ортаны таза ұстаяуға негіз бола алады.

Зерттеу мақсаты калифорниялық шылаушындардың - *Eisenia fetida* биогумус өндірудегі тіршілік қабілеттіліктерін зерттеу және алынған биогумус тыңайтқышының қияр көшеттеріне әсерін анықтау болып табылады [5].

Материалдар мен әдістер

Зерттеу нысанды ретінде калифорниялық шылаушының *Eisenia foetida* алынды. Тәжірибе жұмыстары Қ.Жұбанов атындағы жылыштада жүргізілді. Өсіру ортасының температурасы 15-25°C болды. Алдын-ала бейтараптандырылған (pH 6,7-7,0) ірі қара қара малдың көңі субстрат ретінде қолданылды. Субстратты бейтараптандыру мақсатында көнді таза суда жуып, күнге кептірілді. Кептірілген көң (субстрат) арнайы ағаш жәшіктеге біркелкі деңгейде төсөлді. Кептірілген көңге (субстратқа) құрттарды жіберу үшін 3 нұсқада ағаш жәшіктегі дайындалды. Осы 3 ағаш жәшіктеге құрттардың саны әртүрлі мөлшерде жіберілді. Алдымен құрттардың аналық басы субстратқа енгізілді, одан ары құрттардың аз қоректік ортадан көбірек қоректік ортаға көшуі анықталды.

Қолдануға берілген субстраттың ылғалдылығы 80-85% аралығында тұрақты ұстап отырылды. Құрттардың өсімін анықтау үшін ағаш жәшіктен 10 см тереңдіктері құрттардың саны есептелді, алынған санды 100-ге көбейту арқылы орташа саны есептелді [6].

Нәтижелер және оларды талқылау

Қазіргі уақытта мал шаруашылығымен айналысадын шаруа қожалықтарында көнді қайда жұмсауға болады деген басты мәселе бар. Өйткені, таза көнді тікелей топыраққа қолдануға болмайды. Жаңа шыққан көндде еритін азот қосылыстарына бай болып, еритін минералды тыңайтқыштармен бірдей әсер етеді. Яғни, жапырақтар мен сабақтардың өсуін күштейтеді, бірақ өнімнің түсіміне әсер етпейді. Сондай-ақ, жаңа көңмен қоректендерілген өсімдіктер аурулар мен зиянкестерге сезімтал болып келеді. Сонымен қатар, жаңа шірімеген көндер тез ыдырап, жердің тұрақты құнарлылығына ықпал етпейді. Сондықтан, көнді шіріту қажет, бірақ бұл процесс өте ұзақ уақытты талап етеді. Бұл мәселенің шешіміне жауын құрттарды қолдану арқылы жетуге болады. Құрттар органикалық заттарды түрлендіру процесін күштейтіп, органикалық заттардың белсенді минералдануын тездетеді. Нәтижесінде фосфор және калий сияқты биологиялық белсенді заттар бөліп шығарылады [7,8].

Шылаушындармен биогумус өндіру арнайы топырақ құрылымының пайда болуына әкеледі. Биогумус құрамы өсімдіктердің қоректенуіне ең қолайлы формадағы қоректік заттарға бай болады. Сонымен қатар, оны кез-келген мөлшерде қолдануға болады [9].

Санитарлық нормаларға сәйкес, биогумус көкөністер мен жемістерді өсіруге мүлдем зиянсыз. Вермикомпостинг "A" класының ең жоғары стандартының талаптарын қанағаттандыру үшін патогендік организмдердің концентрациясының тез төмендеуін көрсетті (АҚШ - тың "process to Further Reduce Pathogens" - PFRP талаптарының ең жоғары класы) [10].

Биогумус дайындау үшін шикізат ретінде ірі қара малдардың көңі қолданылады. Осы көнің сақталу мерзімі 6 айдан жоғары болуы керек. Өйткені, құрттар өндейтін көң шірімеген таза болса құрттардың жақсы жұмыс жасаудың кедергі болады. Қоректік заттардың тиімділігін арттыру үшін көңмен бірге жапырақтар, тамақ қалдықтары, үгінділер, әк және шымтезек қосылады. Негізінен орташа есеппен алғанда бір шаршы метр жер көлеміне көнді өндіру үшін 2000-4000 құрт санын қажет етеді.

Зерттеу барысында дайындалған көң ағаш жәшіктеге 25-30 см тереңдікте салынып, жарық түспеуі үшін үстінен қураған шөп төсөледі. Шіріген көң таза сүмен 3 рет жуылып, ашық далада кептіріледі. Кептірілген көң ағаш жәшіктеге салынып, құрттарды шикізаттың үстінгі қабатына біркелкі деңгейде жіберілді. Кептірілген көңге (субстратқа) құрттарды жіберу үшін 3 ағаш жәшік дайындалды. Осы 3 ағаш жәшіктеге құрттардың саны әртүрлі мөлшерде, яғни 1-ағаш жәшікке 2000 дана, 2-ағаш жәшікке 4000 дана, ал 3-ағаш жәшікке 7000 дана құрт жіберіледі (кесте 1).

Кесте 1 - Кептілірген көңгे (субстратқа) құрттарды әртүрлі мөлшерде енгізу

Құрт саны, мың/дана m ³	Субстрат ылғалдылығы, (%)	Температура, (°C)	Биогумустың дайын болу уақыты, (күн)
2000	60-80	15-18	180
4000	50-70	22-24	150
7000	45-65	18-20	135

Осы құрттардың санына байланысты субстрат ылғалдылығын, температураны тұрақты түрде сақтап, биогумус өндіру мерзімі де әр түрлі уақытта болатындығы дәлелденді. Жоғарыда көлтірілген мәліметтерге сүйене отырып, 7000 құрт жіберілген ағаш жәшіктегі биогумус өндіру уақыты 135 күнде дайын болатындығы анықталды (сурет 2).



Сурет 2 - Калифорниялық қызыл шылаушын биогумус дайындау

A – 30 күнде;
Б – 45 күнде;
В – 135 күнде.

Осы уақыт ішінде субстратқа дұрыс күтім жасау және микроклиматты тұрақты ұстап тұру қажет. Сондықтан, зерттеу барысында барлық ағаш жәшіктерге келесідей күтім жасалды:

1. Құрттар толық орналастырылғаннан кейін субстратты бірнеше рет қосытылды;
 2. Айна 4 рет қоректік заттар салынды;
 3. Ылғалдылықты 80-85% деңгейінде сақтау үшін жылы, тұндырылған сумен ылғалдандырылып отырылды;
 4. Температура 20°C-25°C аралығында ұсталды.
- Тәжірибе барысында алынған биогумустың кәдімгі (гумус) қарашіріктің химиялық құрамымен салыстырмалы талдау жүргізілді (кесте 2).

Кесте 2 - Биогумус пен қарашіріктің химиялық құрамы (%)

Атауы	Биогумус	Қара шірік гумус
Органикалық заттар	44,0	23,5
Гумин қышқылдары	3,5	2,5
Фульвоқышқылдары	2,2	1,0
Органикалық көміртек	3,31	1,7
Азот	3,22	1,56
Фосфор	0,48	0,34

Жоғарыда кестеде көрсетілгендей, биогумустың құрамында органикалық заттардың қарашірікке қарағанда 2 есеге дейін көп болатындығы анықталды.

Зерттеу нәтижесінде алынған таза биогумусты қияр көшеттеріне қолдану олардың морфологиялық құрылышының өзгеруіне әсері бар екенідігі анықталды (кесте 3).

Кесте 3 - Қияр көшеттерінің өсуі мен дамуы кезіндегі фенологиялық бақылаулар

Нұсқаулар	Көшеттердің көктеп бастауы, күн	Толық көктеп шығуы, күн	Ұрықтық жапырақтың пайда болу кезеңі, күн	Нағыз жапырақтың пайда болуы, күн
Бақылау	3	4	7	9
Жылышай топырағы	3	4	8	9
Биогумус	3	4	7	9

Кестеде көрсетілгендей, биогумусты қолдану нәтижесінде қияр көшеттері 2-3 -күні тұқымнан көктеп шыға бастады. Алайда, фенологиялық бақылаулар нәтижесінде барлық нұсқаларда фенофазаларының өтуінде ешқандай айырмашылықтар байқалмады.

Кесте 4 - Қияр көшеттерінің биометриялық талдаулар сипаттамасы

Нұсқаулар	Өсімдік биіктігі, см	Жапырақ саны, дана	Жапырақ көлемі, см ²	Тамыр ұзындығы, см	Вегетатив мүшелердің салмағы, г	Тамыр салмағы, г.
Бақылау	36, 3	4	495.7	33.7	22.5	3.8
Жылышай топырағы	38.0	4.8	484.0	35.2	25.2	5.5
Биогумус	66.2	5.8	926.8	36.8	35.8	6.8

4-кестеде көрсетілгендей, қияр көшеттеріне биогумусты пайдалану қияр көшеттерінің биометриялық көрсеткіштеріне-біектігіне, жапырақтардың санына, жапырақтарының көлеміне, салмағына оң әсер көрсететіндігі анықталды. Субстрат ретінде биогумусты және жылышай топырағын қолдану қияр көшеттерінің орталық тамырының ұзындығы мен тамыр салмағы арасындағы айтарлықтай айырмашылықтың болғандығын көрсетті (кесте 4).

Зерттеу нәтижесінде таза биогумуста өсірілген қиярдың көшеттерінің вегетативті мүшелері тамыр жүйесі мен жапырақтарының қарқынды өскендігі анықталды. Биогумустың жоғары мөлшері қиярдың вегетативті салмағының, тамыр жүйесінің салыстырмалы түрде жақсы өсуіне ықпалын тигізді.

Зерттеу нәтижелері бойынша, биогумусты пайдалану топырақтың биологиялық және химиялық қасиеттеріне әсер етеді, агрохимиялық сипаттамаларға оң әсер етеді. Биогумустың құрамында өсімдіктер оңай сініретін көптеген макро және микроэлементтер, дәрумендер мен антибиотиктер, түрлі аминқышқылдары бар. Биогумусты кез-келген көкөністерге қолдануға болады. Биогумустың көмегімен экологиялық таза өнімдер алынады. Сонымен қатар, кейін өсірілетін өсімдіктерге қолайлы орта жасайды. Таза алынған биогумустың құрамында ылғалдық 60-70% дейін сақталады, ол органикалық тыңайтқыштарға қарағанда шамамен 15 есе тиімді. Биогумус өсімдіктердің өсуіне қолайлы болып келді.

Қорытынды

Зерттеу барысында *Eisenia foetida* көмегімен субстратты вермикомпосттау бойынша тәжірибелер жүргізілді. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде *Eisenia foetida* қызыл шылаушаңдарын қолдану арқылы биогумусты өндіру технологиясы жасалды. Сонымен қатар, биогумуске қауынның, алманың қалдықтарының салынуы оның өнімділігін, яғни құрттардың өсімін жоғарылататындығы зерттелді. Биогумусты қолдану қияр көшеттерінің вегетативті салмағының қарқынды өсуіне және тамыр жүйесінің салыстырмалы жақсы өсуіне ықпал ететіндігі анықталды.

Әдебиеттер:

- 1 Оспанова Г.С., Бозшатаева Г.Т., Турабаева Г.К. Использование метода вермикультурирования в экологическом образовании. *Международный журнал экспериментального образования*, 2015, 6: 118-120.
- 2 Чачина С.Б., Чачина С.Б., Караваева О.С. Использование дождевых червей: навозный червь (e. *Fetida*) и калифорнийский червь (e. *Andrei*) для разложения бытовых и промышленных отходов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2014, 10-1: 55-58.
- 3 Ручин А.Б. Применение метода вермикультурирования для биодеградации твердых отходов. *Молодой ученый*, 2013, 3 (50): 168–171.
- 4 Горбунов В.В. *Дождевые черви для повышения урожая*. М., 2013.
- 5 Кунах О.Н. Пространственное варьирование экоморфической структуры почвенной мезофауны урбазема. Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского, 2013, 3: 107-126.
- 6 Сидоренко О.Д., Кутровский В.Н. *Биоконверсия отходов агропромышленного комплекса: учебное пособие для студентов, обучающихся по направлению 110900 "Технология производства и переработка сельскохозяйственной продукции"*. М., 2013.
- 7 Стом Д.И., Казаринова Т.Ф., Титов И.Н. *Дождевые черви в переработке отходов*. Иркутск, 2012.
- 8 Дмитриева В.И., Степанов А.И., Мерзляя Г.Е., Садовникова Л.К., Красильникова С.С. *Вермикультурирование: теория, опыт, практика*. Якутск, 2000.
- 9 Биотехнологии на службе сельского хозяйства. *Материалы Всероссийской научно-практической конференции*, Рязань, 2004.
- 10 Выгузова, М.А. Использование технологии вермикомпостирования в сельском хозяйстве. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2012, 7.
- 11 Выгузова, М.А. Комплекс по переработке органических отходов сельскохозяйственных предприятий и пищевых производств. *Научно-техническое и инновационное развитие АПК России*, 2013: 75-78.
- 12 Brind'Amour, A. Relationships between species feeding traits and environmental conditions in fish communities: A three-matrix approach. *Ecological Applications*, 2011, 21(2).
- 13 Sun, Z. *Vermiculture and vermicompost*. China Agricultural University Press, 2003.

Г.Ж. ЕЩАНОВА*, Н.А. УТАРБАЕВА, А.К. КАЛИЕВА, Б. БАҚЫТЖАНҚЫЗЫ,
Н.А. КЕМАЛОВА

Актюбинский региональный университет им. К. Жубанова, Актобе, Казахстан
*e-mail: bakshagul.94@mail.ru

ВЕРМИКОМПОСТИРОВАНИЕ БИОГУМУСА С ПОМОЩЬЮ КАЛИФОРНИЙСКОГО ЧЕРВЯ *EISENIA FOETIDA* И ПРИМЕНЕНИЕ БИОГУМУСА В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Аннотация

В статье приводятся результаты экспериментальных работ по технологии производства биогумуса из органических отходов с помощью калифорнийского червя *Eisenia foetida* и его использования при выращивании огурцов. В результате исследования черви производили чистый биогумус из навоза крупного рогатого скота в течение 4,5 месяцев. В ходе экспериментальных работ калифорнийских червей поместили в субстрат, где они проявили свою активность на 21 день, демонстрируя активную жизнедеятельность и размножение. При влажности 45-65% в ящиках 7000 червей веркомпостировали биогумус за 4,5 месяца. Полученное органическое удобрение применялось при посадки огурца, и результаты биометрических наблюдений показали его положительное влияние на рост и развитие растений.

Ключевые слова: биогумус, калифорнийский червь, органическое удобрение, рассады огурцов, вермикомпост.

IRSTI: 34.27.05

G.ZH. ESHCHANNOVA*, N.A. UTARBAYEVA, A.K. KALIEVA,
B. BAKYTZHANKYZY, N.A. KEMALOVA

Aktobe Regional University named after K. Zhubanov, Aktobe, Kazakhstan

*e-mail: bakshagul.94@mail.ru

VERMICOMPOSTING OF BIOHUMUS WITH THE CALIFORNIAN WORM *EISENIA FOETIDA* AND ITS USE IN AGRICULTURE

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.06

Abstract

The article presents the results of experimental work on the technology of biohumus production from organic waste using Californian worm *Eisenia foetida* and proves the features of its use in the cultivation of cucumbers. As a result of the study, worms produced pure biohumus from cattle manure for 4.5 months. During the experimental work, Californian worms were placed in the substrate, where they showed their activity for 21 days, demonstrating active life activity and reproduction. At 45-65% moisture content, 7,000 worms verocomposted the biohumus in boxes for 4.5 months. The obtained biohumus fertilizer was used for planting cucumber seedlings and the results of biometric observations showed a positive effect on growth and height, the number and area of leaves, as well as on the vegetative mass of plants.

Keywords: biohumus, California worm, organic fertilizers, cucumber seedlings, vermicompost.

The number of planters and gardeners in the republic is increasing every year. In order for agriculture to get a rich harvest from farming, various fertilizers are needed. Most mineral fertilizers cannot replace natural products that can improve crop quality and volume. However, a special place is occupied by organic fertilizers, which can replace them - biohumus. Currently, the production of these fertilizers is being developed in the country under very simple conditions. Especially in manure derived from animal waste is used to produce biohumus, the most effective and cheapest fertilizer, turning it into fertile black rot by feeding California worm *Eisenia fetida* [1].

The efficiency of bioorganic fertilizer treated in this way - gives 7-8 times more yield compared to other fertilizers.

Interest in California worm *Eisenia fetida* used in biohumus processing first began to develop in the United States in the 1950s of the 20th century. The named worm was obtained by the American Thomas J. Barrett through hybridization of various earthworms in the state of California in 1959 [2].

The California red worm is more active than the common earthworm, reproduces faster, lives longer (up to 15 years compared to the common earthworm) and processes more substrate. This worm requires more heat, moisture, and substrate to grow. The composition of the substrate can be mainly agricultural animal feces, plant waste, and other industrial organic waste [1].

The California red worm is 10 cm long, 3-5 mm in diameter, and has a body weight of about 1 g. It reproduces 150 times faster than an ordinary earthworm. After 21 days, new offspring emerge, and in 90-120 days it passes into the adult form. The offspring of two shubalshans reaches 1.5 thousand per year (Figure 1).



Figure 1 - *Eisenia fetida*

California worms produce biohumus, which quickly and efficiently processes organic manure, animal waste. It is a unique fertilizer whose composition is much higher than that of ordinary humus [3].

Biohumus is odorless, so it is recommended to use it not only in the garden, but also for fertilizing plants in greenhouses. Most often such a complex fertilizer is applied to the soil in spring. It is especially advantageous to apply it to the soil as an important fertilizer during the spring seedling preparation. There are no significant differences between the earthworm and the California worm. However, California worms become more efficient at processing organic matter. As for their habitat, red worms prefer warm environments and do not tolerate frost. Unlike earthworms, California earthworms are adapted to stay on the ground (substrate) rather than come to the surface when it rains. The best place to raise worms is in a compost pit (or pile) and wooden boxes. Manure, poultry manure, straw, dead grasses, vegetable peels, and other organic wastes are used as the main feed. In the process of preparing biohumus, the organic waste is well mixed, moistened, and in 4.5 months the organic matter decomposes completely and turns into biohumus, a good fertilizer for growing plants. The bottom of the container for biohumus preparation must be permeable. There can be used humus, dead plant residues and organic animal waste as an additive. They create a comfortable, soft and nutritious worm habitat. For normal decomposition of organics, the substrate should be stirred gently once a week, providing the mixture with oxygen. California slugs must meet the necessary parameters of acidity, humidity and temperature in the intended substrates [4].

At present, the breeding of *Eisenia foetida* has been established in the country. Since our country is an agricultural country, our goal in the cultivation of Red Californian worm is to produce biohumus, an organic fertilizer necessary for agriculture, and to use it in agriculture to obtain a quality and clean crop and to increase the crop yield. This can also serve as a basis for maintaining a cleaner environment through the efficient use of animal waste.

The aim of the study is to investigate the vital capacity of California slugs producing *Eisenia foetida* biohumus and to determine the effect of the resulting biohumus fertilizer on plants [5].

Materials and methods

Eisenia foetida California worm was taken as an object of study. Experiments were conducted in the greenhouse №1 named after K. Zhubanov.

The temperature of the nutrient medium was 15-25°C. Pre-neutralized (pH 6.7-7) cattle manure was used as a substrate. In order to neutralize the substrate, the manure was washed in clean water and dried in the sun. The dried manure (substrate) was placed evenly in special wooden boxes. For sending worms to the dried manure (substrate), wooden crates were prepared in 3 variants. Different numbers of worms were sent to these 3 wooden boxes. First, a head of female

worms was placed into the substrate, then worm transplants from a less nutritious medium to a more nutritious one were determined.

The humidity of the substrate fed to the application was maintained steadily within the range of 80-85%. To determine worm growth, the number of worms at a depth of 10 cm from the wooden box was calculated, and the average number was calculated by multiplying the obtained number by 100 (Igonin A. M.) [6].

Results and discussion

Nowadays, in peasant farms engaged in animal husbandry, the main question is where to spend the manure. Because pure manure cannot be applied directly to the soil. Fresh manure is rich in soluble nitrogen compounds and has the same effect as soluble mineral fertilizers. That is, it enhances leaf and stem growth but has no effect on yield. In addition, plants fertilized with fresh manure quickly become susceptible to diseases and pests. In addition, fresh, nonrotting manure decomposes quickly and does not contribute to stable soil fertility. Therefore, decomposition of manure is necessary, but this process takes a very long time. A solution to this problem can be achieved with earthworms. Worms enhance the conversion of organic matter and accelerate the active mineralization of organic matter. As a result, biologically active substances such as phosphorus and potassium are released [7,8].

Production of biohumus with alkalis leads to the formation of a special soil structure. Biohumus composition will be rich in nutrients in the form most suitable for plant nutrition. Besides, it can be used in any quantity [9].

According to sanitary standards, biohumus is completely harmless for the cultivation of fruits and vegetables. Biohumus showed rapid reduction of pathogen concentration to meet the requirements of the highest standard of "A" class ("process to Further Reduce Pathogens" in the USA - the highest class of PFRP requirements) [10].

Cattle manure is used as a raw material for preparation of biohumus. The period of storage of this manure should be more than 6 months. This is due to the fact that the manure processed by worms will interfere with the worms to work better if it is clean and not rotten. To increase the efficiency of their nutrients, leaves, food scraps, sawdust, lime and peat are added along with the manure. Generally, it takes an average of 2,000 to 4,000 worms per square meter of land to produce manure.

During the study, the prepared manure was placed in wooden boxes to a depth of 25-30 cm, and dead grass was placed on top to keep the light out. The decomposed manure was washed 3 times with clean water and dried in the open ground. The dried manure was placed in wooden boxes and worms were evenly distributed on the top layer of raw material. For sending worms in dried manure (substrate), 3 wooden boxes were prepared. Different numbers of worms were sent to these 3 wooden crates, that is, 2000 worms in 1 wooden crate, 4000 worms in 2 wooden crates, and 7000 worms in 3 wooden crates (Table 1).

Table 1-Worms in manure (substrate) in different quantities

Nº №	Number of worms, thousand/pc. m ³	Substrate humidity, (%)	Temperature, (°C)	Biohumus readiness time, (month)
1	2000	60-80	15-18	6
2	4000	50-70	22-24	5
3	7000	45-65	18-20	4,5

Depending on the number of these worms, it was proved that the substrate maintains constant humidity, temperature and biohumus production time also in different times. Based on the above data, it was found that in a wooden box where 7000 worms were sent, the time of biohumus production was ready within 4.5 months (Figure 2).



A

Б

В

Figure 2-Preparation of biohumus with California red worms

A-in 30 days;

B-in 45 days;

C- in 135 days.

At this time, proper care of the substrate and maintaining a stable microclimate are necessary. Therefore, during the study, all wooden boxes were cared for as follows:

- 1.After the worms were fully penetrated, the substrate was loosened several times;
- 2.Nutrients were applied 4 times a month;
- 3.Moisturized with warm, standing water to maintain the humidity at 80-85%;
- 4.The temperature is maintained between 20°C and 25°C.

During the experiment, a comparative analysis of the obtained biohumus with the chemical composition of conventional (humus) humus was carried out. (Table 2).

Table 2 - Chemical composition of biohumus and humus (%)

The name	Biohumus	Humus
Organic substances	44,0	23,5
Humic acids	3,5	2,5
Fulvic Acids	2,2	1,0
Organic carbon	3,31	1,7
Nitrogen	3,22	1,56
Phosphorus	0,48	0,34

Based on the data we showed in the table above, it was found that biohumus contains 2 times more organic matter than humus.

It was also found that the application of pure biohumus obtained in the study to plant seedlings has an effect on changes in their morphological structure (Table 3)

Table 3 - Phenological observations in the growth and development of cucumber seedlings

Instructions	From the spring, the dates			
	Sprouting	Full sprouting	Period of nucleated leaf formation	Real leaf emergence
To control	3	4	7	9
Greenhouse soil	3	4	8	9
Biohumus	3	4	7	9

As can be seen from the table for all variants of the experiment on the use of biohumus for cucumber seedlings, seed germination appeared on the 2-3rd day in all variants en masse. However, according to the results of phenological observations, there was no difference in the passage of phenophases in all variants.

Table 4 - Description of biometric analyses of cucumber seedlings

Instructions	Plant height, cm	Number of leaves, pcs.	Sheet volume, cm ²	Root length, cm	Severity of vegetative organs, g	Weight of the root, g.
To Control	36, 3	4	495.7	33.7	22.5	3.8
Greenhouse soil	38.0	4.8	484.0	35.2	25.2	5.5
Biohumus	66.2	5.8	926.8	36.8	35.8	6.8

Based on the table, based on the results of biometric observations during the use of biohumus in the substrate, it was found that the variant of applying biohumus in the substrate had a positive effect on plant height, number of leaves, leaf area, plant weight. It was found that when using biohumus in substrate and greenhouse soil, there was a significant difference between the length of the central root, root mass (Table 4).

During the study, the analysis of the growth rate of vegetative parts of cucumbers and root system showed that the greatest intensity of leaf surface growth was observed when growing seedlings with pure biohumus. The high content of biohumus contributed to intensive growth of vegetative mass, relatively good growth of the root system was observed.

Research results show that the use of biohumus affects the biological and chemical properties of the soil, which ultimately has a positive effect on agrochemical characteristics. Biohumus contains a large number of macro and microelements, many vitamins and antibiotics, various amino acids, which are assimilated by plants in the shortest possible time. Biohumus can be used for any vegetables. With the help of biohumus get environmentally friendly products. It also creates favorable environment for growing any plants, vegetables, fruits from very infertile or dead soil for the next plants to grow. The pure biohumus obtained retains moisture up to 60-70%, about 15 times more effective than organic fertilizers. Biohumus has become favorable for plant growth.

Conclusion

Experiments on substrate biohumus with Eisenia foetida were carried out during the study. As a result of this research, the technology of eisenia foetida biohumus production using redheads was developed. During the experiment, it was found that in increasing the productivity of biohumus, there was a high growth of worms on the ground, where the residues of melons, apples were deposited. In addition, application of biohumus contributed to intensive growth of vegetative mass of cucumber seedlings and relatively good growth of root system was observed.

References:

- 1 Ospanova G.S., Bozshataeva G.T., Turabaeva G.K. The use of the vermicultivation method in environmental education. *International Journal of Experimental Education*, 2015, 6: 118-120;
- 2 Chachina S.B., Chachina S.B., Karavaeva O.S. The use of earthworms: dung worm (e. Fetida) and California worm (e. Andrey) for the decomposition of household and industrial waste. *International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2014, 10-1: 55-58.
- 3 Ruchin A.B. Application of the vermicultivation method for biodegradation of solid waste. *Young scientist*, 2013, 3 (50): 168–171.
- 4 Gorbunov V.V. *Earthworms to increase the yield*. M., 2013
- 5 Kunakh O.N. Spatial variation of the ecomorphic structure of the soil mesofauna of urbazem. Scientific notes of V.I.Vernadsky Tauride National University. 2013, 3: 107-126.

6 Sidorenko O.D., Kutrovsky V.N. Bioconversion of waste from the agro-industrial complex: a textbook for students studying in the direction 110900 "Technology of production and processing of agricultural products". M., 2013.

7 Stom D.I., Kazarinova T.F., Titov I.N. *Earthworms in waste processing*. Irkutsk, 2012

8 Dmitrieva V.I., Stepanov A.I., Merzlaya G.E., Sadovnikova L.K., Krasilnikova S.S. *Vermiculture: theory, experience, practice*. Yakutsk, 2000.

9 Biotechnologies in the service of agriculture. *Proceedings of the All-Russian Scientific and Practical Conference*, Ryazan, 2004.

10 Vyguzova, M.A. The use of vermicomposting technology in agriculture. *Storage and processing of agricultural raw materials*, 2012, 7.

11 Vyguzova, M.A. Complex for processing organic waste of agricultural enterprises and food production. *Scientific, technical and innovative development of the agro-industrial complex of Russia*, 2013: 75-78.

12 Brind'Amour, A. Relationships between species feeding traits and environmental conditions in fish communities: A three-matrix approach. *Ecological Applications*, 2011, 21(2).

13 Sun, Z. *Vermiculture and vermicprotein*. China Agricultural University Press, 2003.

МРНТИ: 34.27.51

А.К. САДАНОВ, Н.Н. ГАВРИЛОВА, И.А. РАТНИКОВА*, С.Э. ОРАЗЫМБЕТ,
Е.Ж. ШОРАБАЕВ, Ж.Т. МУСАБЕКОВ, Р.Ж. КАПТАГАЙ, Л.Е. ПРОТАСЮК,
Л.А. КОШЕЛЕВА, С.Б. ДЖАЙЛЯУОВА

Промышленная микробиология, Алматы, Казахстан

*e-mail: iratnikova@list.ru

АССОЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.07

Аннотация

При изучении антагонистической активности двух пробиотических ассоциаций выявлено, что ассоциация со штаммами *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36, превосходит в жидким и сухом виде известную ассоциацию *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2 по спектру antimикробного действия и величине антагонистической активности, которая может быть использована для создания эффективных лечебных пробиотических препаратов.

Ключевые слова: ассоциация бактерий, пробиотик, антагонизм, кишечные инфекции.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) – одна из актуальных проблем здравоохранения во всех стран [1], в том числе и Казахстана. Так, в Казахстане среди зарегистрированных инфекционных заболеваний в январе-декабре 2019 года, на втором месте после острых инфекций дыхательных путей стояли ОКИ – 22997 случаев [2]. Повсеместная распространенность, высокая частота развития среднетяжелых и тяжелых форм, осложнений определяют необходимость поиска путей оптимизации тактики лечения данной группы заболеваний.

Сложность лечения инфекционных заболеваний связана с массовым нерациональным использованием антибиотиков и химиотерапевтических препаратов, приведшему к развитию множественной лекарственной устойчивости патогенов [3]. Кроме того, применение антибиотиков нередко сопровождается изменением качественного и количественного состава кишечной микробиоты. Показано, что нарушения микробиоты (дисбиоз) предрасполагают к развитию различных болезней желудочно-кишечного тракта, атопии, ожирения, метаболического синдрома, сахарного диабета, ревматоидного артрита, злокачественных новообразований и, возможно, других патологий [4-7]. В связи с этим, в последнее время в мире для лечения кишечных инфекций все чаще вместо антибиотиков рекомендуют использовать пробиотики на основе микроорганизмов - симбионтов желудочно-кишечного тракта.

В настоящее время фармакологические пробиотические препараты считаются наиболее адекватными и эффективными средствами для поддержания и коррекции микроэкологии человека на оптимальном уровне.

Пробиотики относятся к группе медицинских иммунобиологических препаратов на основе живых бактерий, антагонистически активных в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов - возбудителей различных инфекционных заболеваний и не оказывающих отрицательного влияния на представителей нормальной микрофлоры человека. Чаще всего, пробиотические препараты используют для профилактики и лечения острых кишечных инфекций и коррекции дисбиотических состояний. Подобная терапия сопровождается, как правило, позитивными сдвигами в системе неспецифической иммунологической защиты организма и приводит к повышению сопротивляемости организма к воздействию неблагоприятных факторов.

В настоящее время на рынке появилось много зарубежных пробиотических препаратов на основе живых микроорганизмов. В рейтинг лучших пробиотических средств, нормализующих деятельность желудочно-кишечного тракта, способствующих восстановлению иммунитета, улучшающих обменные процессы, вошли: Бифидумбактерин, Бифидумбактерин Форте, Лактобактерин, Пробифор, Аципол (Россия), Энтерол (Франция), Бифиформ (Дания) [8]. Вместе с тем, известные лечебно-профилактические пробиотики против кишечных инфекций не всегда эффективны [9, 10]. Причиной этого является недостаточно широкий антимикробный спектр действия, не подбираются антагонисты к конкретным возбудителям заболеваний.

Одним из основных критериев отбора микроорганизмов в состав пробиотиков является выраженность спектра их антагонистической активности в отношении различных возбудителей инфекционных заболеваний.

Исходя из выше перечисленного, целью настоящего исследования был отбор наиболее активной пробиотической ассоциации по антагонистической активности для создания пробиотика, активного в отношении возбудителей кишечных и внекишечных инфекций. В качестве контроля был взят препарат Плантафермин на основе штаммов *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2, показавший эффективность в отношении кишечных инфекций человека [11, 12].

Материал и методы исследований

Ассоциация бактерий *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 отобрана из лабораторной коллекции молочнокислых бактерий с высокой антимикробной и ферментативной активностью, выделенных от здоровых людей.

Штамм *L. fermentum* 30 получен из популяции сублимационно высушенной культуры *L. fermentum* 29, выделенной из кишечника здорового человека. Представлен грамположительными, аспорогенными, неподвижными, палочками размером 0,5-0,7x1,0-3,0 мкм с тупыми концами, чаще одиночными, но встречаются короткие цепочки. При росте на плотной питательной среде образует плоские, круглые, шероховатые колонии. При росте в жидкой питательной среде образуется равномерная муть. Сбраживает галактозу, лактозу, мальтозу, маннозу, мелибиозу, раффинозу, сахарозу. Целлобиозу, маннит, рамнозу, ксилозу, сорбит не использует или ферментирует слабо. Восстанавливает нитраты, из аргинина образует аммиак. Слабо подкисляет молоко. Гидролизует крахмал. Оптимальный рост при 37°C, хорошо растет при 45°C, при 15°C рост ограничен. Использует органические источники азота: пептон, дрожжевой автолизат, мясной экстракт, кукурузный экстракт, экстракт солодовых ростков. H₂S и индол не образует. Не обладает каталазной активностью. Непатогенный. Обладает высокой антимикробной активностью с широким спектром действия и повышенной устойчивостью к высушиванию.

Штамм *L. cellobiosus* 36 выделен из популяции сублимационно высушенной культуры *L. cellobiosus* 35. Представляет собой палочки с закругленными концами вариабельных размеров: 0,5-0,7x1,5-5,5мкм, неподвижные, аспорогенные, грамположительные. Палочки расположены одиночно, в коротких цепочках (по 3-5 клеток), иногда в более длинных цепочках. При росте в жидкой питательной среде образуется равномерная взвесь с прозрачным кольцом в верхнем слое. Поверхностные колонии на плотной питательной среде плоские, ризоидные, глубинные - светло-желтые, чечевидные. Ферментирует арабинозу, рибозу, целлобиозу, галактозу, глюкозу, глюконат, раффинозу, мальтозу, мелибиозу, сахарозу. Слабая реакция на лактозу, маннозу, ксилозу. Образует CO₂ при сбраживании глюкозы и глюконата. Не сбраживает маннит, рамнозу. Из аргинина образует аммиак. Молоко в течение двух суток не сквашивает. Растет при 15°C и не растет при 45°C. Оптимальная для роста температура 35°C. Использует органические источники азота: пептон, дрожжевой автолизат или экстракт, мясной экстракт. Индол и H₂S не образует. Не патогенный. Обладает высокой антимикробной активностью с широким спектром действия.

Для исследований ассоциации культур *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2, а также *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 выращивали каждую отдельно в течение 24 ч при 35°C в питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 15,0; дрожжевой экстракт – 5,0; мясной экстракт – 5,0; пептон – 10,0; аммоний лимоннокислый – 2,0; натрий уксуснокислый – 2,0; калий фосфорнокислый 1-замещенный – 2,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный – 2,0; магний сернокислый – 0,2; марганец сернокислый – 0,05; кобальт хлористый – 0,01; pH – 6,5-7,0; вода питьевая – до 1л.

Для сублимационного высушивания в жидкие ассоциации добавляли защитные компоненты: 7% сахарозы и 1,5% желатина + 7% СОМ. После этого препараты разливали в стерильные пенициллиновые флаконы по 5 мл и высушивали в сублимационной сушилке Liobeta-35. Наработанные опытные партии сухих препаратов заложены на хранение в холодильнике при температуре от 2 до 8°C.

Определение антагонистической активности ассоциаций проводили методом диффузии в агар в отношении тест-культур *Staphilococcus aureus* MRSA 9, *Staphilococcus aureus* MRSA 3316, *Shigella flexneri* 11, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae* 444, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* 835, *Pseudomonas aeruginosa* 342, *Proteus sp.*, *Mycobacterium B₅*, *Candida albicans* проводили по диаметру зон подавления их роста [13].

Численность микроорганизмов в сухих препаратах устанавливали путем ряда последовательных разведений в стерильной водопроводной воде и высева их в агаризованную питательную среду MRS с последующим подсчетом выросших колоний.

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [14]. Статистическую достоверность полученных результатов определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований антагонистической активности исследуемых ассоциаций после их культивирования в течение 24 ч в жидкой питательной среде представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика антагонистической активности различных ассоциаций бактерий

Тест-организмы	Зоны подавления роста тест-организмов, мм	
	Варианты ассоциаций бактерий	
	<i>L. fermentum</i> 27 + <i>L. plantarum</i> 2в/2	<i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36
1	2	3
<i>E. coli</i>	15,5±0,7	22,0±0,3
<i>S. gallinarum</i>	14,0±0,9	21,0±0,4
<i>Sh. flexneri</i> 11	0	17,0±0,5
<i>S. aureus</i> 3316	14,0±0,5	17,0±0,5
<i>S. aureus</i> 9	17,5±0,5	25,0±0,4
<i>K. pneumoniae</i> 444	18,0±0,3	26,0±0,5
<i>C. albicans</i>	16,0±0,2	25,0±0,3
<i>P. multocida</i>	18,0±0,3	25,0±0,5
<i>P. aeruginosa</i> 342	13,0±0,8	26,0±0,7
<i>P. aeruginosa</i> 835	9,0± 0,2	22,0±0,6
<i>Acinetobacter sp.</i> 1132	15,0± 0,5	26,0±0,5
<i>Acinetobacter sp.</i> 1522	0	16,0±0,5
<i>Proteus sp.</i>	14,0±0,5	18,0±0,6
<i>Mycobacterium B₅</i>	20,0±1,0	28,0±0,9

Как видно из представленной таблицы, ассоциация из штаммов *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 обладает более широким спектром действия и более высокой антимикробной активностью по сравнению с ассоциацией *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2. Так, в отличие от противопоставляемой ассоциации, у нее выявлена антагонистическая активность в отношении *Acinetobacter sp.* 1522 и *Shigella flexneri* 11, а также отмечено повышение антагонизма в отношении всех исследованных тест-культур, в особенности к *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter sp.* 1132 и *Mycobacterium* B5.

Титр бактерий исследуемых ассоциаций определяли в сублимационно высушенных препаратах исходных и после их хранения в течение 4, 7 и 12 месяцев в холодильнике (таблица 2).

Таблица 2 - Содержание жизнеспособных клеток пробиотических бактерий в сублимационно высушенных препаратах и после их хранения в холодильнике

Ассоциации	Титр жидкой культуры, млрд КОЕ/мл	Содержание бактериальных клеток в сухих препаратах , млрд КОЕ/г			
		Исходные после высушивания	Через 4 месяца хранения	Через 7 месяцев хранения	Через 12 месяцев хранения
<i>L. fermentum</i> 27 и <i>L. plantarum</i> 2в/2	6,5±0,3x10 ⁹	3,8±0,3x10 ⁹	3,0±0,3x10 ⁹	3,0±0,2x10 ⁹	2,0±0,2x10 ⁹
<i>L. fermentum</i> 30 и <i>L. cellobiosus</i> 36	7,8±0,4x10 ⁹	6,7±0,3x10 ⁹	6,0±0,3x10 ⁹	6,0±0,3x10 ⁹	5,6±0,2x10 ⁹

По результатам таблицы видно, что в сухих препаратах в течение срока наблюдений (12 месяцев) хорошо сохранилась жизнеспособность пробиотических бактерий. Более высокий титр бактерий отмечен у ассоциации., состоящей из бактерий *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36.

Изучена также антагонистическая активность пробиотических препаратов после их сублимационного высушивания и хранения (таблица 3).

Таблица 3 - Антагонистическая активность высушенных ассоциаций исходных и после 4,7 и 12 месяцев хранения

Ассоциация	Тест-культуры	Зоны подавления роста тест-культур,мм			
		Исходные после высушивания	Через 4 месяца хранения	Через 7 месяца хранения	Через 12 месяца хранения
1	2	3	4	5	6
<i>L. fermentum</i> 27 и <i>L. plantarum</i> 2в/2	<i>E. coli</i>	13,0±0,5	12,5±0,4	12,0±0,5	11,5±0,5
	<i>S. gallinarum</i>	10,5±0,2	9,5±0,4	9,0±0,4	9,0±0,3
	<i>S. aureus</i> 3316	12,5±0,3	11,0±0,5	11,0±0,7	10,5±0,6
	<i>S. aureus</i> 9	14,0±0,5	12,5±0,6	12,0±0,3	12,0±0,6
	<i>K. pneumoniae</i> 444	15,5±0,6	13,5±0,3	13,0±0,5	12,6±0,4
	<i>C. albicans</i>	13,0±0,3	12,0±0,5	12,0±0,6	11,5±0,3
	<i>P. multocida</i>	15,0±0,5	14,0±0,2	13,0±0,5	12,0±0,4
	<i>P. aeruginosa</i> 342	11,0±0,4	10,5±0,3	10,5±0,6	10,0±0,6
	<i>P. aeruginosa</i> 835	9,0±0,2	9,0±0,2	9,0±0,5	8,5±0,3
	<i>Acinetobacter</i> sp. 1132	12,0±0,2	11,0±0,2	10,0±0,2	10,0±0,5
	<i>Acinetobacter</i> sp. 1522	0	0	0	0

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
<i>L. fermentum</i> 30 и <i>L. cellobiosus</i> 36	<i>Proteus sp.</i>	12,5±0,4	11,5±0,6	11,0±0,5	10,5±0,3
	<i>Mycobacterium B₅</i>	17,5±0,5	15,0±0,6	14,0±0,3	14,0±0,6
	<i>E. coli</i>	18,0±0,5	16,0±0,4	16,0±0,6	15,0±0,5
	<i>S. gallinarum</i>	19,5±0,2	17,5±0,4	16,0±0,5	15,0±0,3
	<i>S. aureus</i> 3316	15,5±0,3	14,0±0,5	13,0±0,5	13,5±0,6
	<i>S. aureus</i> 9	19,5±0,4	17,5±0,7	16,0±0,3	15,0±0,5
	<i>K. pneumoniae</i> 444	22,0±0,5	20,5±0,4	20,0±0,5	19,6±0,5
	<i>C. albicans</i>	22,0±0,6	20,0±0,5	19,0±0,7	18,5±0,6
	<i>P. multocida</i>	22,0±0,7	20,0±0,4	19,0±0,5	18,0±0,5
	<i>P. aeruginosa</i> 342	24,0±0,6	20,5±0,5	19,0±0,4	18,0±0,6
	<i>P. aeruginosa</i> 835	22,0±0,5	20,0±0,3	19,0±0,2	18,5±0,4
	<i>Acinetobacter sp.</i> 1132	22,0±0,5	21,0±0,6	20,0±0,5	19,0±0,6
	<i>Acinetobacter sp.</i> 1522	12,0±0,3	11,0±0,4	10,0±0,5	10,0±0,4
	<i>Proteus sp.</i>	12,5±0,4	11,0±0,5	10,0±0,2	10,5±0,4
	<i>Mycobacterium B₅</i>	22,0±0,5	20,0±0,5	19,0±0,5	19,0±0,3

Установлено, что после сублимационного высушивания антагонизм не выявлен у ассоциации бактерий *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2 в отношении *Acinetobacter sp.* 1522. В отношении остальных тест-культур зоны подавления роста сухим препаратом уменьшились на 1-2 мм в дальнейшем в течение срока наблюдений (12 месяцев) менялись незначительно. В сухом препарате исследуемой ассоциации культур антагонизм после сублимационного высушивания сохранился ко всем исследованным тест-культурям, при этом зоны подавления их роста были значительно выше, чем у противопоставляемой ассоциации, кроме тест-культуры *Proteus sp.* (зоны подавления роста у обеих ассоциаций 12,5 мм). Сохранение антагонистической активности на достаточном уровне отмечено ко всем тест-культурям в течение 12 месяцев.

Сопоставление полученных данных показало, что ассоциация из культур *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 обладает более широким спектром антимикробного действия и более высокой антагонистической активностью по сравнению с ассоциацией *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2. Так, в отличие от противопоставляемой ассоциации, у нее выявлена антагонистическая активность в отношении *Acinetobacter sp.* 1522 и *Shigella flexneri* 11, а также отмечено повышение антагонизма в отношении всех исследованных тест-культур, в особенности к *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter sp.* 1132 и *Mycobacterium B₅*.

Таким образом, установлено, что ассоциация со штаммами *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36, превосходит в жидким и сухом виде известную ассоциацию *L. fermentum* 27 + *L. plantarum* 2в/2 по титру бактерий, а также по спектру антимикробного действия и величине антагонистической активности.

Литература:

- 1 World Health Organization, World health statistics 2011. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564199> Accessed: 10.01.2023
- 2 “Заболеваемость населения Республики Казахстан в 2019 году” <https://www.zakon.kz/5008014-zabolevaemost-naseleniya-respublik.html> Дата обращения: 09.01.2023
- 3 Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A. Antibiotic Resistance in Modern World. *Pediatr. Pharmacol.*, 2017, 14(5): 341–354 (doi: 10.15690/pf.v14i5.1782).
- 4 S. Prakash *et al.* Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biol. Targets Ther.*, 2011; 71 (doi: 10.2147/btt.s19099).

- 5 Ianiro G., Bibbò S., Gasbarrini A. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(8): 762–770.
- 6 Ушканова Е. А., Зырянов С. К. Место препаратов, влияющих на микробиоту кишечника, в современной медицине. *Педиатрия*, 2017, 2:37-42.
- 7 Sturov N. V., Popov S. V., Zhukov V. A. Modern approaches to the correction of the gut microbiota. *Meditinskij Sov.*, 2021, 2021(4):136–143 (doi: 10.21518/2079-701X-2021-4-136-143).
- 8 Merenstein D., Salminen. S. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*, 2017: 35.
- 9 Millette M., Nguyen A., Amine K. M., Lacroix M. GASTROINTESTINAL SURVIVAL OF BACTERIA IN COMMERCIAL PROBIOTIC PRODUCTS. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 2013, 8(4): 149–156.
- 10 Мендибаева Б.Б. Социально-гигиеническая оценка особенности формирования кишечной инфекции населения Южно-Казахстанской области. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*, 2017, 2: 450–455.
- 11 Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А. Ассоциация бактерий для производства препарата *Плантафермин (варианты)*. Ин.патент № 21861 РК. Опубл. 16.11.2009 г., Бюл. №11.
- 12 А.К. Саданов, Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова. Штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* 2в/2, предназначенный для включения в состав лечебно-профилактических препаратов против желудочно-кишечных заболеваний. Патент №30868 РК. Опубл. 25.12.2015 г., Бюл. №12.
- 13 Егоров Н.С. *Основы учения об антибиотиках*, 1994.
- 14 Урбах В.Ю. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М., 1975.

А.К. САДАНОВ, Н.Н. ГАВРИЛОВА, И.А. РАТНИКОВА*, С.Э. ОРАЗЫМБЕТ,
Е.Ж. ШОРАБАЕВ, Ж.Т. МУСАБЕКОВ, Р.Ж. КАПТАГАЙ, Л.Е. ПРОТАСЮК,
Л.А. КОШЕЛЕВА, С.Б. ДЖАЙЛЯУОВА

Оңдірістік микробиология, Алматы, Қазақстан

*e-mail: iratnikova@list.ru

МИКРОБҚА ҚАРСЫ ӘСЕРІНІЦ ҚЕҢ СПЕКТРІ БАР ДӘРІЛІК ПРОБИОТИКАЛЫҚ ПРЕПАРАТТЫ ӨНДІРУГЕ АРНАЛҒАН БАКТЕРИЯЛАР ҚАУЫМДАСТЫҒЫ

Түйін

Екі пробиотикалық қауымдастықтың антагонистік белсенделілігін зерттеу кезінде, *L. fermentum* 30 және *L. cellobiosus* 36 штаммдарымен бірге ассоциация сұйық және құргақ түрде микробқа қарсы әсер ету спектрі және тиімді емдік пробиотикалық препараттарды жасау үшін пайдаланылуы мүмкін антагонистік белсенделілік шамасы бойынша белгілі *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2 қауымдастығынан асып түсетіні анықталды.

Кілтті сөздер: бактериялар қауымдастығы, пробиотик, антагонизм, ішек инфекциясы.

IRSTI: 34.27.51

A.K. SADANOV, N.N. GAVRILOVA, I.A. RATNIKOVA*, S.E. ORAZYMBET,
E.ZH. SHORABAEV, ZH.T. MUSABEKOV, R.ZH. KAPTAGAI, L.E. PROTASIU,
L.A. KOSHELEVA, S.B. DZHAILAUOVA
Industrial Microbiology, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: iratnikova@list.ru

BACTERIA ASSOCIATION FOR THE PRODUCTION OF A THERAPEUTIC PROBIOTIC DRUG WITH A WIDE SPECTRUM OF ANTIMICROBIAL ACTION

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.07

Abstract

When studying the antagonistic activity of two probiotic associations, it was found that the association with *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 strains exceeds the known association of *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2 in terms of the spectrum of antimicrobial action and the magnitude of antagonistic activity in both liquid and dry forms. This features can be used to create effective therapeutic probiotic preparations.

Keywords: bacteria association, probiotic, antagonism, intestinal infections.

Acute intestinal infections (AII) are one of the urgent health problems in all countries [1], including Kazakhstan. Thus, in Kazakhstan, among the diagnosed infectious diseases in January-December 2019, AII was in second place after acute respiratory infections - 22997 cases [2]. The ubiquity, high incidence of moderate and severe forms, and complications determine the need to find ways to optimize the tactics of treating this group of diseases.

The complexity of the infectious diseases treatment is associated with the massive irrational antibiotics and chemotherapeutic drugs use, which led to the pathogens' multidrug resistance development [3]. Moreover, the use of antibiotics is often accompanied by a change in the qualitative and quantitative composition of the intestinal microbiota. It has been shown that microbiota disorders (dysbiosis) predispose to the development of various diseases of the gastrointestinal tract, atopy, obesity, metabolic syndrome, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, malignant neoplasms, and possibly other pathologies [4-7]. Therefore, recently in the world it is increasingly recommended to use probiotics based on microorganisms - symbionts of the gastrointestinal tract for the treatment of intestinal diseases instead of antibiotics.

Nowadays, pharmacological probiotic preparations are considered as the most sufficient and effective means for human microecology correction and maintenance at an optimal level.

Probiotics belong to the group of medical immunobiological preparations based on live bacteria, antagonistically active against pathogenic and opportunistic microorganisms that cause various infectious diseases and do not adversely affect representatives of the normal human microflora. Generally, probiotic preparations are used for the prevention and treatment of acute intestinal infections and the correction of dysbiotic conditions. Such therapy is often accompanied by positive changes in the system of nonspecific immunological defense of the body and leads to increased body resistance to the adverse factors.

On the modern market, there are many foreign probiotic preparations based on live microorganisms. The ranking of the best probiotics that normalize the gastrointestinal tract function, increase immunity, and improve metabolic processes includes: Bifidumbacterin, Bifidumbacterin Forte, Lactobacterin, Probifor, Acipol (Russia), Enterol (France), Biform (Denmark) [8]. However, widely used therapeutic probiotics for the intestinal infections treatment are not always effective [9, 10]. The reason is a narrow spectrum of antimicrobial action and the absence of the antagonists' selection to the specific pathogens.

One of the main criteria for the selection of microorganisms for the probiotics composition is the severity of their antagonistic activity against various infectious pathogens.

According to the above-mentioned, the purpose of this study was the selection of the most active probiotic association in terms of antagonistic activity in order to create a probiotic that is active against pathogens of intestinal and extraintestinal infections. The Plantafermin preparation consisting of *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2 association, that demonstrated efficacy in intestinal infections treatment, was used as a control [11, 12].

Materials and methods

An association of *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 was selected from the collection of human origin lactic acid bacteria with high antimicrobial and enzymatic activity.

The *L. fermentum* 30 strain was obtained from a population of freeze-dried *L. fermentum* 29 culture isolated from the intestines of a healthy person. It is represented by gram-positive, asporogenic, immobile, rods 0.5-0.7x1.0-3.0 μm in size with blunt ends, often single, but short chains can also be found. On a dense nutrient medium, it forms flat, round, rough colonies. In a liquid nutrient medium, a uniform turbidity is present. The culture ferments galactose, lactose, maltose, mannose, melibiose, raffinose, and sucrose, while cellobiose, mannitol, rhamnose, xylose, and sorbitol are not fermented or weakly fermented. Restores nitrates, forms ammonia using arginine, weakly acidifies milk and hydrolyzes starch. Optimum growth is detected at 37°C, at 45°C the culture grows well, at 15°C the growth is limited. Organic nitrogen sources, such as peptone, yeast autolysate, meat extract, corn extract, and malt sprout extract are utilized. The *L. fermentum* 30 strain does not form H₂S and indole, does not have catalase activity and is not pathogenic. It has high antimicrobial activity with a wide spectrum of action and increased resistance to drying.

The *L. cellobiosus* 36 strain was isolated from a population of freeze-dried culture of *L. cellobiosus* 35. It is represented by rods with rounded ends of variable sizes: 0.5-0.7x1.5-5.5 μm , immobile, asporogenic, and gram-positive. The rods are located separately, in short (3-5 cells each) or longer chains. In a liquid nutrient medium, a uniform suspension with a transparent ring in the upper layer is usually formed. Superficial colonies on a dense nutrient medium are flat and rhizoidal, while the profound ones are light yellow and lenticular. The strain ferments arabinose, ribose, cellobiose, galactose, glucose, gluconate, raffinose, maltose, melibiose, and sucrose. Has a weak reaction to lactose, mannose, and xylose. It forms CO₂ during the fermentation of glucose and gluconate, does not ferment mannitol and rhamnose. The *L. cellobiosus* 36 strain forms ammonia from arginine, does not ferment milk for two days. Grows at 15°C, but not at 45°C. The optimum temperature for growth is 35°C. The strain uses organic sources of nitrogen: peptone, yeast autolysate or extract and meat extract, does not form Indole and H₂S and is not pathogenic. It has high antimicrobial activity with a wide spectrum of action. The strains are harmless for human and animal.

L. fermentum 27 and *L. plantarum* 2B/2 association and *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 association were used in this study. Each bacterial combination was cultivated separately for 24 hours at 35°C in a nutrient medium with the following composition (g/l): glucose - 15.0; yeast extract - 5.0; meat extract - 5.0; peptone - 10.0; ammonium citrate - 2.0; sodium acetate - 2.0; potassium phosphate 1-substituted - 2.0; sodium 2-substituted phosphate - 2.0; magnesium sulfate - 0.2; manganese sulfate - 0.05; cobalt chloride - 0.01; pH - 6.5-7.0; fresh water - up to 1 liter.

For freeze drying, protective components were added to liquid associations: 7% sucrose and 1.5% gelatin + 7% SMP. After that, the preparations were poured into sterile penicillin vials of 5 ml and dried in a Liobeta-35 freeze dryer. The accumulated experimental batches of dry preparations were stored in the refrigerator at temperatures from 2 to 8°C.

Then the antagonistic activity against *Staphilococcus aureus* MRSA 9, *Staphilococcus aureus* MRSA 3316, *Shigella flexneri* 11, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumonia* 444, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* 835, *Pseudomonas aeruginosa*

342, *Proteus* sp. *Mycobacterium B₅*, and *Candida albicans* test cultures was determined through the evaluation of growth inhibition zones [13].

The number of microorganisms in dry preparations was determined by a series of dilutions in sterile tap water and inoculation into an MRS agar nutrient medium, followed by counting the grown colonies.

For mathematical processing of the results, standard methods for finding the mean values and their mean errors were used [14]. The statistical significance of the results obtained was determined by Student's t-test. Differences were considered statistically significant at p<0.05.

Results and discussion

The results of assessment of the antagonistic activity of the studied associations after their cultivation for 24 hours in a liquid nutrient medium are presented in Table 1.

Table 1 – Comparative characteristics of different bacterial associations' antagonistic activity.

Test-cultures	Test-cultures' growth inhibition zones, mm	
	Bacterial associations	
	<i>L. fermentum</i> 27 + <i>L. plantarum</i> 2B/2	<i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36
1	2	3
<i>E. coli</i>	15,5±0,7	22,0±0,3
<i>S. gallinarum</i>	14,0±0,9	21,0±0,4
<i>Sh. flexneri</i> 11	0	17,0±0,5
<i>S. aureus</i> 3316	14,0±0,5	17,0±0,5
<i>S. aureus</i> 9	17,5±0,5	25,0±0,4
<i>K. pneumoniae</i> 444	18,0±0,3	26,0±0,5
<i>C. albicans</i>	16,0±0,2	25,0±0,3
<i>P. multocida</i>	18,0±0,3	25,0±0,5
<i>P. aeruginosa</i> 342	13,0±0,8	26,0±0,7
<i>P. aeruginosa</i> 835	9,0±0,2	22,0±0,6
<i>Acinetobacter</i> sp. 1132	15,0±0,5	26,0±0,5
<i>Acinetobacter</i> sp. 1522	0	16,0±0,5
<i>Proteus</i> sp.	14,0±0,5	18,0±0,6
<i>Mycobacterium B₅</i>	20,0±1,0	28,0±0,9

As can be seen from the table, the association of strains *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 has a wider spectrum of action and higher antimicrobial activity compared to the *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2. In contrast to another association, it demonstrated an antagonistic activity against *Acinetobacter* sp. 1522 and *Shigella flexneri* 11, and an increase in antagonism against all studied test cultures, especially *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter* sp. 1132 and *Mycobacterium B₅*.

The titer of bacteria of the studied associations was determined in freeze-dried preparations and after their storage for 4, 7, and 12 months in the refrigerator (table 2).

Table 2 - The content of probiotic bacteria viable cells in freeze-dried preparations and after their storage in the refrigerator

Assosiations	Liquid culture titer, billion CFU/ml	The content of microbial cells in freeze-dried preparations, billion CFU/g			
		Initial after freeze-drying	After 4 months of storage	After 7 months of storage	After 12 months of storage
<i>L. fermentum</i> 27 and <i>L. plantarum</i> 2B/2	6.5±0.3x10 ⁹	3.8±0.3x10 ⁹	3.0±0.3x10 ⁹	3.0±0.2x10 ⁹	2.0±0.2x10 ⁹
<i>L. fermentum</i> 30 and <i>L. Cellobiosus</i> 36	7.8±0.4x10 ⁹	6.7±0.3x10 ⁹	6.0±0.3x10 ⁹	6.0±0.3x10 ⁹	5.6±0.2x10 ⁹

According to the results presented in the table, it can be seen that the viability of probiotic bacteria was well preserved in dry preparations during the observation period (12 months). A higher titer of bacteria was noted in the association of *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36.

The antagonistic activity of probiotic preparations after freeze-drying and storage was also studied (Table 3).

Table 3 - Antagonistic activity of freeze-dried associations, initial and after 4, 7, and 12 months of storage

Assosiation	Test-cultures	Test-cultures' growth inhibition zones, mm			
		Initial after freeze-drying	After 4 months of storage	After 7 months of storage	After 12 months of storage
<i>L. fermentum</i> 27 and <i>L. plantarum</i> 2в/2	<i>E. coli</i>	13.0±0.5	12.5±0.4	12.0±0.5	11.5±0.5
	<i>S. gallinarum</i>	10.5±0.2	9.5±0.4	9.0±0.4	9.0±0.3
	<i>S. aureus</i> 3316	12.5±0.3	11.0±0.5	11.0±0.7	10.5±0.6
	<i>S. aureus</i> 9	14.0±0.5	12.5±0.6	12.0±0.3	12.0±0.6
	<i>K. pneumoniae</i> 444	15.5±0.6	13.5±0.3	13.0±0.5	12.6±0.4
	<i>C. albicans</i>	13.0±0.3	12.0±0.5	12.0±0.6	11.5±0.3
	<i>P. multocida</i>	15.0±0.5	14.0±0.2	13.0±0.5	12.0±0.4
	<i>P. aeruginosa</i> 342	11.0±0.4	10.5±0.3	10.5±0.6	10.0±0.6
	<i>P. aeruginosa</i> 835	9.0±0.2	9.0±0.2	9.0±0.5	8.5±0.3
	<i>Acinetobacter</i> sp. 1132	12.0±0.2	11.0±0.2	10.0±0.2	10.0±0.5
	<i>Acinetobacter</i> sp. 1522	0	0	0	0
	<i>Proteus</i> sp.	12.5±0.4	11.5±0.6	11.0±0.5	10.5±0.3
	<i>Mycobacterium</i> B ₅	17.5±0.5	15.0±0.6	14.0±0.3	14.0±0.6
<i>L. fermentum</i> 30 and <i>L. cellobiosus</i> 36	<i>E. coli</i>	18.0±0.5	16.0±0.4	16.0±0.6	15.0±0.5
	<i>S. gallinarum</i>	19.5±0.2	17.5±0.4	16.0±0.5	15.0±0.3
	<i>S. aureus</i> 3316	15.5±0.3	14.0±0.5	13.0±0.5	13.5±0.6
	<i>S. aureus</i> 9	19.5±0.4	17.5±0.7	16.0±0.3	15.0±0.5
	<i>K. pneumoniae</i> 444	22.0±0.5	20.5±0.4	20.0±0.5	19.6±0.5
	<i>C. albicans</i>	22.0±0.6	20.0±0.5	19.0±0.7	18.5±0.6
	<i>P. multocida</i>	22.0±0.7	20.0±0.4	19.0±0.5	18.0±0.5
	<i>P. aeruginosa</i> 342	24.0±0.6	20.5±0.5	19.0±0.4	18.0±0.6
	<i>P. aeruginosa</i> 835	22.0±0.5	20.0±0.3	19.0±0.2	18.5±0.4
	<i>Acinetobacter</i> sp. 1132	22.0±0.5	21.0±0.6	20.0±0.5	19.0±0.6
	<i>Acinetobacter</i> sp. 1522	12.0±0.3	11.0±0.4	10.0±0.5	10.0±0.4
	<i>Proteus</i> sp.	12.5±0.4	11.0±0.5	10.0±0.2	10.5±0.4
	<i>Mycobacterium</i> B ₅	22.0±0.5	20.0±0.5	19.0±0.5	19.0±0.3

It was established that after freeze-drying, no antagonism was detected for the *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2в/2 association against *Acinetobacter* sp. 1522. In relation to the rest test cultures, the zones of growth suppression by the dry preparation decreased by 1-2 mm, and then changed insignificantly during the observation period (12 months). In a dry preparation from the studied association, the antagonistic activity after freeze-drying was preserved towards all the studied test cultures, while the zones of growth inhibition were significantly higher than in the opposite association, except for the *Proteus* sp. test culture (growth suppression zones in both associations were 12,5 mm). The preservation of antagonistic activity at a sufficient level was noted for all test cultures for 12 months.

The comparison of the obtained data showed that the *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 association has a wider spectrum of antimicrobial activity and higher antagonistic activity

compared to the association of *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2в/2. So, in contrast to the opposing association, it showed antagonistic activity against *Acinetobacter sp.* 1522 and *Shigella flexneri* 11, as well as an increase in antagonism against all of the studied test cultures, especially against *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter sp.* 1132 and *Mycobacterium B5*.

Thus, it has been established that the *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 association exceeds the known *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2в/ 2 association in both liquid and dry forms by the microbial titer, as well as by the spectrum of antimicrobial action and the magnitude of antagonistic activity.

References:

- 1 World Health Organization, *World health statistics 2011*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564199> Accessed: 10.01.2023
- 2 Zabolevaemost' naselenija Respubliki Kazahstan v 2019 godu. Available: <https://www.zakon.kz/5008014-zabolevaemost-naseleniya-respubliki.html> Accessed: 09.01.2023
- 3 Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A. Antibiotic Resistance in Modern World. *Pediatr. Pharmacol.*, 2017, 14(5): 341–354 (doi: 10.15690/pf.v14i5.1782).
- 4 S. Prakash *et al.* Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biol. Targets Ther.*, 2011: 71 (doi: 10.2147/btt.s19099).
- 5 Ianiro G., Bibbò S., Gasbarrini A. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(8): 762–770.
- 6 Ushkalova E. A., Zyrjanov S. K. Mesto preparatov, vlijajushhih na mikrobiotu kishechnika, v sovremennoj medicine. *Pediatrija*, 2017, 2:37-42.
- 7 Sturov N. V., Popov S. V., Zhukov V. A. Modern approaches to the correction of the gut microbiota. *Meditinskij Sov.*, 2021, 2021(4):136–143 (doi: 10.21518/2079-701X-2021-4-136-143).
- 8 Merenstein D., Salminen. S. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*, 2017: 35.
- 9 Millette M., Nguyen A., Amine K. M., Lacroix M. GASTROINTESTINAL SURVIVAL OF BACTERIA IN COMMERCIAL PROBIOTIC PRODUCTS. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 2013, 8(4): 149–156.
- 10 Mendibaeva B.B. Social'no-gigienicheskaja ocenka osobennosti formirovaniya Kishechnoj infekcii naselenija Juzhno-Kazahstanskoy oblasti. *Vestnik Kazahskogo Nacional'nogo medicinskogo universiteta*, 2017, 2: 450–455.
- 11 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Asociacija bakterij dlja proizvodstva preparata Plantafermin (varianty). In.patent № 21861 RK. Opubl. 16.11.2009 g., Bjul. №11.
- 12 A.K. Sadanov, N.N. Gavrilova, I.A. Ratnikova. Shtamm bakterij *Lactobacillus plantarum* 2v/2, prednaznachennyj dlja vkljuchenija v sostav lechebno-profilakticheskikh preparatov protiv zheludochno-kishechnyh zabolovanij. Patent №30868 RK. Opubl. 25.12.2015 g., Bjul. №12.
- 13 Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah, 1994.
- 14 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. M., 1975.

МРНТИ: 62.01.91

А.Б. АЛТЕКЕЙ^{1*}, А.А. САПАРБЕКОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА²,
А.А. СЕЙТМАГЗИМОВ¹, А.Ш. МАМБАЕВА³

¹Южно-Казахстанский университет им. М. Ауезова, Шымкент, Казахстан

²Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

³Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: altekey@mail.ru

БИОДЕГРАДАЦИЯ ЛИГНИНА СОЛОМЫ КУЛЬТУРОЙ ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*, ВЫДЕЛЕННОЙ С ПОВЕРХНОСТИ ДЕРЕВА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.08

Аннотация

Одной из глобальных проблем, с которой человечество столкнулось в последнее столетие, является загрязнение окружающей среды. Большая часть токсичных выбросов приходится на различные виды производств, одним из которых является целлюлозно-бумажное. Традиционное целлюлозно-бумажное производство подразумевает использование щелочей и кислот, попадающих впоследствии в окружающую среду со сточными водами вместе с трудноразлагаемым лигнином. С учетом повышения спроса на целлюлозо-бумажные расходные материалы разработка новых экологично-безопасных технологий для целлюлозно-бумажной промышленности становится крайне актуальной. Одним из предложенных способов решения проблемы является биологический метод предварительной обработки сырья при целлюлозно-бумажном производстве.

На стадии предварительной обработки сырья химическим способом происходит разрыв ковалентных связей между целлюлозой и лигнином, биологический же способ подразумевает биодеструкцию целлюлозо-лигниновых связей, с использованием ферментов, синтезируемых микроорганизмами.

В данной статье описана работа, в ходе которой была выделена чистая культура гриба *Schizophyllum commune*, с поверхности коры частично разрушенного дерева, способный, синтезировать необходимые ферменты для разложения древесины. Постановка эксперимента дало Данные полученные в ходе эксперимента дали оптимистичные прогнозы о возможности замены традиционного способа предварительной обработки сырья на микробиологический, так как под действием ферментов, синтезируемых грибом *S. commute*, количество лигнина в соломе снизилось практически в два раза с 17,61% до 9,09%.

Ключевые слова: биодеградация, лигнин, древесина, чистая культура, субстрат.

В связи с наличием больших посевных площадей злаковых культур, потенциально перспективным направлением для Казахстана является исследование возможности использования соломы в качестве сырья для целлюлозно-бумажной промышленности [1, 2]. Пшеничная солома может служить ресурсным альтернативным сырьем для целлюлозно-бумажного производства, особенно для производства специальных и функциональных сортов бумаги, таких как фильтровальная бумага. Солома на 15% состоит из лигнина, на 35-45% - из целлюлозы, оставшиеся 20-30% приходятся на гемицеллюлозу [3, 4]. Благодаря своей рыхлой текстуре она легко подвергается воздействию реагентов во время предварительной обработки. Однако проблема отделения лигнина от целлюлозы до сих пор полностью не решена. Лицнин является одним из составляющих компонентов растительной клетки, по значимости занимающий третье место после целлюлозы и гемицеллюлозы. Суммарно все три компонента обеспечивают прочность клеточной стенки. Помимо всего, за лигнином закреплены такие функции как прохождение воды по сосудистым тканям, антимикробный барьер и защита полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлозы) от гидролиза вследствие действия микробных ферментов [5, 6]. Сложность отделения лигнина от целлюлозы заключается в образовании ковалентной связи между ними и наличии

различных функциональных групп в лигнине, таких как гидроксильные, метоксильные, карбоксильные и карбонильные. Соотношение вышеуказанных групп зависит от источника лигнина [7]. Сухая масса клеточной стенки на 20-35% состоит из лигнина, в зависимости от растения, мягкая древесина - на 25-35%, а лиственная древесина - на 20-25% [8].

Такие физико-химические и механические методы предварительной обработки как кислотная, щелочная и применение парового взрыва не являются предпочтительными по некоторым причинам: изменение структуры лигнина, токсические выбросы, большие финансовые расходы [9, 10]. Можно сказать, что биологический метод разложения лигнина является альтернативным методом предварительной обработки древесного и недревесного сырья благодаря экологической безопасности и экономической выгоды. В качестве агентов процесса биоразложения лигнина чаще всего используют грибы, а именно грибы белой гнили. Механизм действия микроорганизмов на сырье заключается в атаке лигнина и его разложении, что приводит к размягчению сырья. Группа микроорганизмов, разлагающих лигнин, продуцирует необходимые для этого ферменты: лигнинпероксидазу, лакказу и марганцевую пероксидазу [11].

В настоящем исследовании в целях биодеградации лигнина соломы был отобран гриб *Schizophyllum commune* с древесины растущего дерева (рисунок 1). Использование данного гриба обусловлено наличием его лигнинолитической активности, способности синтезировать лигнинпероксидазу, лакказу и марганцевую пероксидазу [12, 13].



Рисунок 1 – Гриб *Schizophyllum commune*

Объекты и методы исследования

Выделение чистой культуры гриба *S. commune*

Образец гриба был отобран с поверхности дерева в стерильный пакет, на следующий день в стерильных условиях перенесен на твердую питательную среду Сабуро и термостатирован при 25°C на пять суток. Полученный мицелий, свойственный грибу *S. commune*, был пересеян пятикратно до получения однородного роста, свидетельствующем о чистоте культуры. Инокуляты получали путем смыва культуры *S. commune* с поверхности питательной среды Сабуро 0,9% раствором натрия хлорида.

Биодеградация лигнина соломы

В эксперименте использовали питательную среду, приготовленную на основе соломы. В коническую колбу Эrlenmeyera поместили 10 г соломы, измельченной с помощью мельницы ЛК200 до размера частиц 45 мкм, добавляли 0,01 г глюкозы, 5 мл 0,0004% раствора твина и стерилизовали в автоклаве на протяжении 15 мин при 121°C. Затем в асептических условиях добавляли 5 мл инокулята культуры *S. commune* и термостатировали при 25°C. Пробы на анализ отбирали каждые 5 дней.

Анализ образцов

Анализ остаточного лигнина проводили каждые 5 суток на протяжении 4-х недель. В колбу Эрленмейера высипали 1 г (а) инокулированного препарата, добавляли 150 мл дистиллированной воды и доводили до 90-100°C на протяжении 1 часа, отфильтровывали, раствор промывали 300 мл горячей дистиллированной воды, высушивали до постоянного веса. Сухой осадок добавляли в колбу со 150 мл 1N H₂SO₄ и доводили до 90-100°C на протяжении 1 часа, отфильтровали, раствор промывали 300 мл горячей дистиллированной воды, высушивали до постоянного веса (с). Полученный сухой осадок добавляли в колбу с 72% H₂SO₄ и оставляли на 4 часа при комнатной температуре. Спустя 4 часа в смесь добавляли 150 мл 1N H₂SO₄ и доводили до 90-100°C на протяжении 1 часа, отфильтровали, раствор промывали 400 мл дистиллированной воды, высушивали в сушильном шкафу при 105°C до постоянной массы (д). Затем этот же осадок высушивали до состояния пепла и взвешивали (е).

Расчет выполняли по следующей формуле:

$$\% \text{ целлюлозы} = \frac{c-d}{a} \times 100\%,$$

$$\% \text{ лигнина} = \frac{d-e}{a} \times 100\%,$$

где: а - вес образца,

с – вес массы при втором взвешивании,

д - вес массы при третьем взвешивании,

е – вес пепла.

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы было выделение чистой культуры *S. commune* (рисунок 2) и приготовление инокулята.

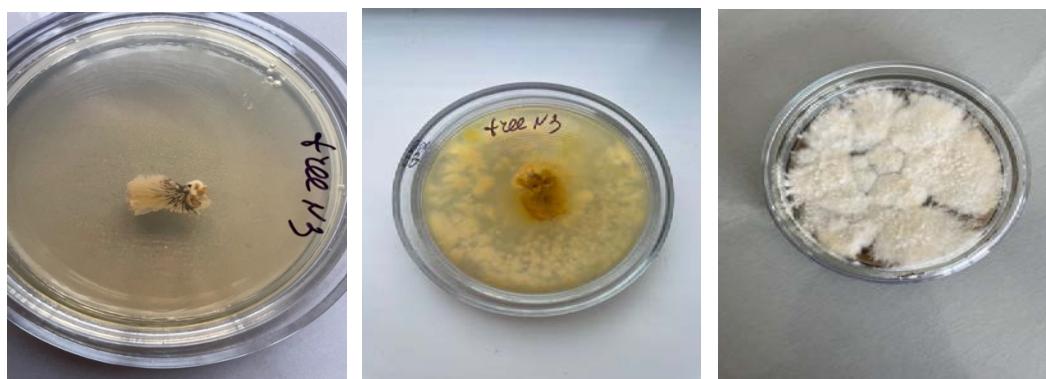


Рисунок 2 – Выделение чистой культуры гриба *S. commune*

Следующим этапом было культивирование гриба на субстрате с соломой, измельченной до 45 мкм, на протяжении 20 суток при температуре 25°C. Процесс биодеградации лигнина соломы предоставлен в виде схемы на рисунке 3.

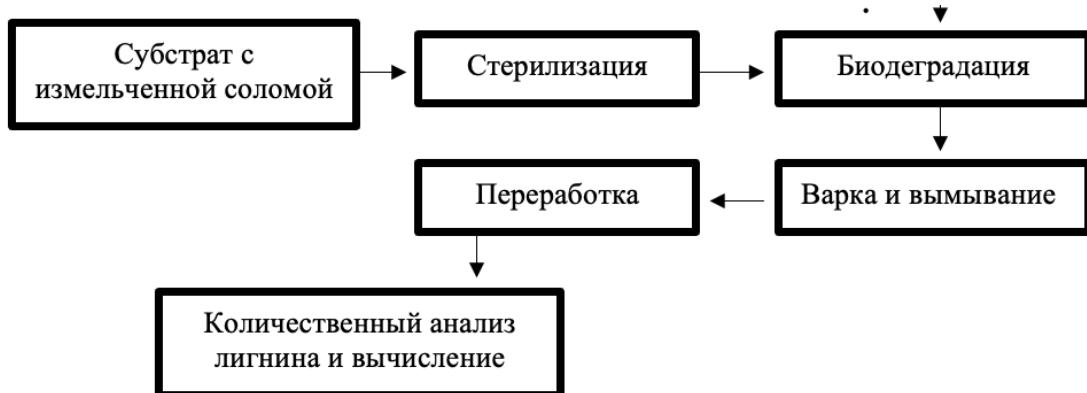
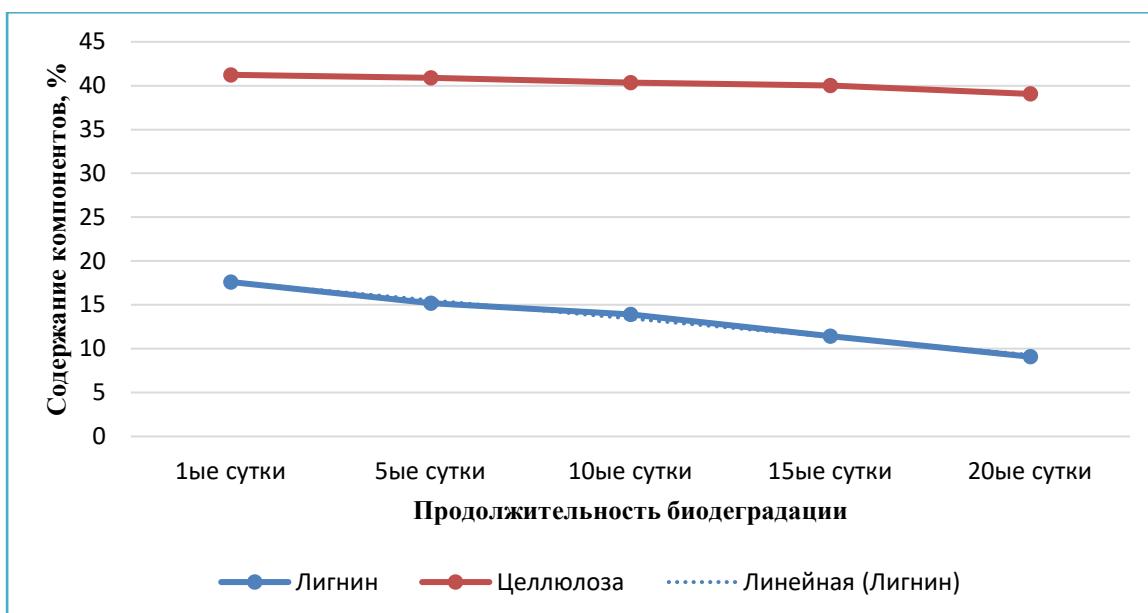


Рисунок 3 – Схема биодеградации лигнина соломы

Образцы отбирали каждые 5 дней и анализировали на количество остаточного лигнина и целлюлозы. Результаты иллюстрированы на рисунке 4 и представлены в таблице 1.

Рисунок 4 - Мониторинг количества лигнина и целлюлозы соломы в ходе биодеградации культурой *S. commitee* на протяжении 20 днейТаблица 1 - Мониторинг количества лигнина и целлюлозы соломы в ходе биодеградации культурой *S. commitee* на протяжении 20 дней

Время культивирования, сутки	Содержание лигнина, %	Содержание целлюлозы, %
1	17,61	41,24
5	15,19	40,88
10	13,91	40,34
15	11,43	40,02
20	9,09	39,06

На основании данных, представленных в таблице 1, можно сделать вывод о том, что биодеградация лигнина соломы культурой *S. commitee* возможна; причём благодаря добавлению избыточного количества источника углевода в виде раствора глюкозы, целлюлоза остается практически нетронутой.

Помимо количественных методов анализа на остаточное количество лигнина были сделаны снимки на растровом электронном микроскопе для оценки изменения структуры соломы до биодеградации (рисунок 5а) и после процесса биодеградации (рисунок 5б).

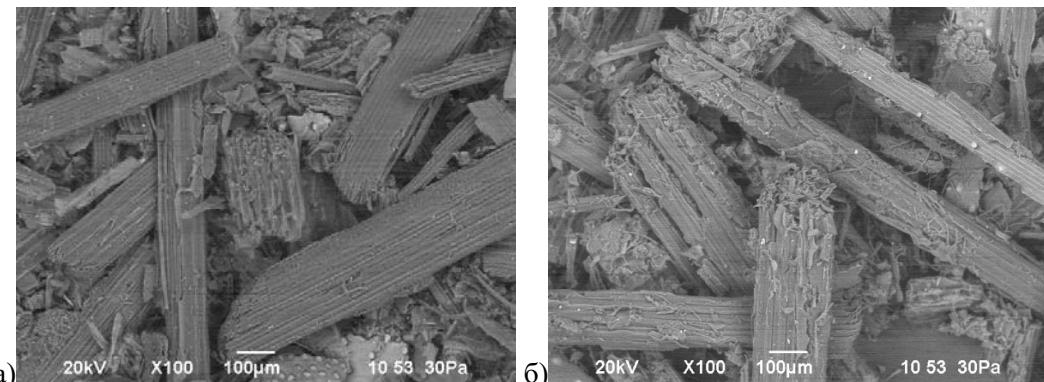


Рисунок 5 – Изменение структуры соломы: а) до биодеградации, б) после биодеградации

На снимках видны изменения в структуре соломы. Если до процесса биодеградации грибом *S. commite* солома имела однородную целостную структуру, то после биодеградации структура соломы стала рыхлой, неоднородной, некоторые участки разделились на более мелкие частицы, что позволяет сделать вывод о том, что данный древоразрушающий гриб способен расщеплять лигнин-целлюлозные связи в соломе.

Таким образом установлено, что в контрольном образце содержание лигнина составляло 17,61% от массы, к концу деградации, на 20-й день - 9,09%, что практически в два раза меньше изначального количества. Также на положительные показатели биодеградации лигнина повлиял размер помола соломы - до 45 мкм. Полученные результаты оптимистичны, так как в схожей научной работе с данной культурой микроорганизма авторам удалось добиться деградации лигнина соломы лишь на 21% [14]. Соответственно можно сделать вывод, что данный способ использования культуры *S. commite* при целлюлозно-бумажном производстве и переработке отходов сельского хозяйства актуален и перспективен.

Заключение

Представленные результаты данной работы служат доказательством биоразлагаемости лигнина соломы культурой древоразрушающего гриба *S. commite*. Согласно проведенным исследованиям, на 20-е сутки культивирования гриба при 25°C на измельченной до 45 мкм соломе с добавлением глюкозы, количество лигнина снизилось с 17,61% до 0,09%. Биодеградация лигнина в целом может заменить механические и химические методы предварительной обработки сырья при целлюлозо-бумажном производстве, что значительно сократит расходы на дорогостоящие реагенты и снизит количество вредных промышленных выбросов в окружающую среду.

Литература:

- 1 Abd-Elsalam H.E., El-Hanafy A.A. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil. In: *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2009: Vol. 5, Issue 1. P. 39-44.
- 2 Atiresh G., Parrish C.C., Banoub J., Le T.T. Lignin degradation by microorganisms: A review. In: *Biotechnol. Prog.*, 2022: Vol. 38, Issue 2. (doi.org/10.1002/btpr.3226).
- 3 Beisl S., Friedl A., Miltner A. Lignin from Micro- to Nanosize: Applications. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 2017: Vol. 18, Issue 11. Art. ID 2367. (doi.org/10.3390/ijms18112367).
- 4 Chang A.J., Fan J., Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. In: *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2012: Vol. 72. P. 26–30.

5 Christopher L.P., Yao B., Ji Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. In: *Front. Energy Res.*, 2014: Vol. 2. (doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012)

6 Khan M.U., Ahring B.K. Anaerobic biodegradation of wheat straw lignin: The influence of wet explosion pretreatment. In: *Energies.*, 2021: Vol. 14, Issue 18. Art. ID. 5940. (doi.org/10.3390/en14185940)

7 Małachowska E., Dubowik M., Boruszewski P., Łojewska J., Przybysz P. Influence of lignin content in cellulose pulp on paper durability. In: *Sci. Rep.*, 2020: Vol. 10, Issue 1. Art. ID 19998. (doi.org/10.1038/s41598-020-77101-2)

8 Malik S., Rana V., Joshi G., Gupta P.K., Sharma A. Valorization of wheat straw for the paper industry: Pre-extraction of reducing sugars and its effect on pulping and papermaking properties. In: *ACS Omega*, 2020: Vol. 5, Issue 47. P. 30704–30715. (doi.org/10.1021/acsomega.0c04883)

9 Muhammad Irshad. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state medium banana stalks. In: *Afr. J. Biotechnol.*, 2011: Vol. 10, Issue 79. (doi.org/10.5897/AJB11.2242)

10 Ververis C., Georgiou K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R., Corletti V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. In: *Bioresour. Technol.*, 2007: Vol. 98, Issue 2. P. 296–301. (doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.007)

11 Wang Lei, Wang Wangui, Ji Xiang, Cai Lu. Biodegradation of lignin by the white rot fungus *Polyporus varius* and its promising potential for biopulping. In: *Renew. Energy Environ.: Int. Conf. Mater.* -Shanghai, 2011: P. 464–468.

12 Xiong Y., Zhao Y., Ni K., Shi Y., Xu Q. Characterization of ligninolytic bacteria and analysis of alkali-lignin biodegradation products. In: *Pol. J. Microbiol.*, 2020: Vol. 69, Issue 3. P. 339–347. (doi.org/10.33073/pjm-2020-037)

13 Xu G., Wang X., Hu J. Biobleaching of wheat straw pulp using laccase and xylanase. In: *BioResources*, 2013: Vol. 8, Issue 3. P. 3181–3188.

14 Kumar V. P., Sridhar M., Rao R. G. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants. In: *Scientific Reports*, 2022. Vol. 1, Issue 12. Art. ID 11170. (doi.org/10.1038/s41598-022-15211-9).

А.Б. АЛТЕКЕЙ^{1*}, А.А. САПАРБЕКОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА²
А.А. СЕЙТМАГЗИМОВ¹, А.Ш. МАМБАЕВА³

¹М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан

²Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

³ Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: altekey@mail.ru

АҒАШ БЕТИНЕН ОҚШАУЛАНГАН *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* САҢЫРАУҚУЛАҒЫНЫҢ Дақылымен сабан лигнинін биодеградациясы

Түйін

Өткен ғасырда адамзат бетпе-бет келген жаһандық мәселелердің бірі – қоршаған органдардың ластануы. Улы шығарындылардың көпшілігі әртүрлі өндіріс түрлерінен келеді, олардың бірі целлюлоза мен кағаз. Дәстүрлі целлюлоза және кағаз өндірісі сілтілерді, кышқылдарды пайдалануды қамтиды, нәтижесінде олар ағынды сулармен және әрен ыдырайтын лигнинмен қоршаған ортаға қосылады. Кеңсе тауарларына, бір рет қолданылатын целлюлоза орамалдарына және кағаз орауыш материалдарына жыл сайынғы сұраныс тек қана есіп келе жатқанын ескерген жөн, бұл целлюлоза-кағаз өнеркәсібі үшін жаңа экологиялық таза технологияларды дамытуға сұранысты арттырады. Мәселені шешудің ұсынылған жолдарының бірі – целлюлоза-кағаз өндірісінде шикізатты алдын ала өндеудің биологиялық әдісі.

Шикізатты алдын ала өндөу сатысында целлюлоза мен лигнин арасындағы коваленттік байланыстар үзіледі, бұл үшін дәстүрлі түрде сілтілер мен қышқылдар қолданылады, ал биологиялық әдіс микроорганизмдер синтездейтін ферменттердің көмегімен целлюлоза-лигнин байланыстарын биодеструкциялауды қамтиды.

Бұл жұмыста ағаштың (закымдалған немесе жергілікті ыдырайтын) қабығының бетінен ағаштың ыдырауына қажетті ферменттерді синтездейтін *Schizophyllum commune* саңырауқұлакты таңдадық. Тәжірибе орнату шикізатты алдын ала өндөудің дәстүрлі әдісін микробиологиялық әдіспен ауыстыру мүмкіндігі туралы оптимистік болжамдар берді, өйткені *S. commune* саңырауқұлакты синтездеген ферменттердің әсерінен сабандағы лигнин мөлшері екі есеге дерлік азайды. 17,61%-дан 9,09%-га дейін.

Кілтті сөздер: биодеградация, лигнин, ағаш, таза дақыл, субстрат.

IRSTI: 62.01.91

A.B. ALTEKEY^{1*}, A.A. SAPARBEKOVA¹, Y.A. OLENIKOVA²,
A.A. SEITMAGZIMOV¹, A.Sh. MAMBAYEVA³

¹South Kazakhstan University named after M. Auezov, Shymkent, Kazakhstan

²Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

³ Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: altekey@mail.ru

BIODEGRADATION OF STRAW LIGNIN BY CULTURE OF THE FUNGUS *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* ISOLATED FROM THE TREE SURFACE

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.08

Abstract

One of the global problems that mankind has faced in the last century is environmental pollution. Most of the toxic emissions come from various types of production, one of which is pulp and paper. Traditional pulp and paper production involves the use of alkalis and acids, subsequently released into the environment with wastewater along with hardly decomposable lignin. Given the increasing demand for pulp and paper consumables, the development of new environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry is becoming extremely relevant. One of the proposed ways to solve the problem is the biological method of pre-treatment of raw materials in pulp and paper production.

At the stage of pre-treatment of raw materials by a chemical method, the covalent bonds between cellulose and lignin are broken, while the biological method involves the biodestruction of cellulose-lignin bonds using enzymes synthesized by microorganisms.

In this work, we selected a fungus *Schizophyllum commune* that synthesized the necessary enzymes for wood decomposition from the surface of a partly decomposed tree bark. The setting of the experiment gave optimistic predictions about the possibility of replacing the traditional method of pre-treatment of raw materials with a microbiological one, since under the action of enzymes synthesized by the fungus *S. commune*, the amount of lignin in the straw almost halved from 17.61% to 9.09%.

Keywords: biodegradation, lignin, wood, pure culture, substrate.

With the rapid development of various manufacturing industries and great attention to the environmental situation, scientists are increasingly turning to biotechnology in order to find alternative natural solutions. So, for example, due to the lack of forest plantations in Kazakhstan, and the presence of large sown areas of cereal crops, a potentially promising direction for the republic is to study the possibility of using straw as a raw material for the pulp and paper industry [1, 2].

Wheat straw is a resource alternative raw material for pulp and paper production, especially for the production of specialty and functional grades of paper, such as filter paper. Straw consists of 15% lignin, 35-45% cellulose, the remaining 20-30% is hemicellulose [3, 4]. Due to its loose texture, it is easily attacked by reagents during pre-treatment. However, the problem of separating lignin from cellulose has not yet been completely solved. Lignin is one of the constituent components of the plant cell in importance, ranking third after cellulose and hemicellulose. In total, all three components provide the strength of the cell wall. In addition to everything, lignin has such functions as: the passage of water through vascular tissues, an antimicrobial barrier and the protection of polysaccharides (cellulose and hemicellulose) from hydrolysis as a result of the action of microbial enzymes. [5, 6]. The complexity of separating lignin from cellulose lies in the formation of a covalent bond between them and the presence of various functional groups in lignin, such as: hydroxyl, methoxy, carboxyl and carbonyl. The ratio of the above groups depends on the source of lignin [7]. The dry mass of the cell wall is 20-35% lignin, depending on the plant, soft wood is 25-35%, and hardwood 20-25% [8].

Such physico-chemical and mechanical pre-treatment methods such as: acid, alkali and steam explosion are not preferred for several reasons: a) the structure of lignin changes; b) toxic emissions; c) high financial costs [9, 10]. It can be said that the biological method of lignin decomposition is an alternative method of pre-treatment of wood and non-wood raw materials due to environmental safety and economic benefits. As agents of the process of biodegradation of lignin, fungi are most often used, namely white rot fungi. The mechanism of action of microorganisms on raw materials is the attack of lignin and its decomposition, which leads to softening of raw materials. A group of microorganisms that decompose lignin produce the enzymes necessary for this (lignin peroxidase (LiP), laccase (Lac) and manganese peroxidase (MnP)) [11].

Schizophyllum commune was selected for the biodegradation of straw lignin from the wood of a growing tree (figure 1). The use of this particular fungus is due to its ligninolytic activity, and ability to synthesize lignin peroxidase, laccase, and manganese peroxidase [12, 13].



Figure 1 - Mushroom *Schizophyllum commune*

Materials and methods of research

Isolation of a pure culture of the fungus S. commune

A sample of the fungus was taken from the surface of the tree in a sterile bag, the next day under sterile conditions it was transferred to a Sabouraud's solid nutrient medium and thermostated for 25°C for five days. The resulting mycelium characteristic of the fungus *S. commune* was subcultured five times until uniform growth was obtained, indicating the purity of the culture. The inoculum was obtained by washing the culture of *S. commune* from the surface of Sabouraud culture medium with 0.9% sodium chloride solution.

Biodegradation of straw lignin

In the experiment, a nutrient medium prepared on the basis of straw was used. 10 g of straw crushed with a mill LK200 to a particle size of 45 μm was placed in a conical Erlenmeyer flask. Then 0.01 g of glucose and 5 ml of tween 0.0004% solution was added and the medium was sterilized in an autoclave for 15 minutes at 121° C, then 5 ml of *S. commune* culture inoculum was added under aseptic conditions and thermostated at 25°C. Samples for analysis were taken every 5 days.

Sample analysis

Residual lignin analysis was performed every 5 days for 4 weeks. 1 g (a) of the inoculated preparation was poured into an Erlenmeyer flask, 150 ml of distilled water was added and brought to 90-100°C for 1 hour, the solution was filtered, washed with 300 ml of hot distilled water, and dried to constant weight. The dry precipitate was added to a flask with 150 ml of 1N H₂SO₄ and brought to 90-100°C for 1 hour and filtered, the solution was washed with 300 ml of hot distilled water, dried to constant weight (s). The resulting dry precipitate was added to a flask with 72% H₂SO₄ and left for 4 hours at room temperature. After 4 hours, 150 ml of 1N H₂SO₄ and brought to 90-100°C for 1 hour and the solution was filtered, washed with 400 ml of distilled water, dried in an oven at 105°C to constant weight (d). Then the same precipitate was dried to ash and weighed (e).

The calculation was performed according to the following formula:

$$\% \text{ cellulose} = \frac{c-d}{a} \times 100\%,$$

$$\% \text{ lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100\%,$$

where: a is the weight of the sample,

c - weight of the mass at the second weighing,

d - weight of the mass at the third weighing,

e is the weight of the ash.

Results and discussion

The first stage of the work was the isolation of a pure culture of *S. commune* (figure 2), and inoculum preparation.

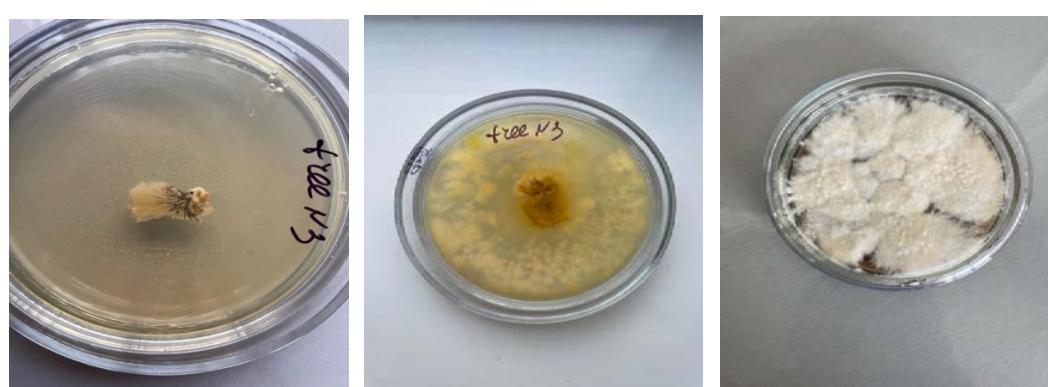


Figure 2 - Isolation of a pure culture of the fungus *S. commune*

The next step was the cultivation of the fungus on a substrate with straw crushed to 45 microns for 20 days at a temperature of 25°C. The process of biodegradation of straw lignin is presented in the form of a diagram in figure 3.

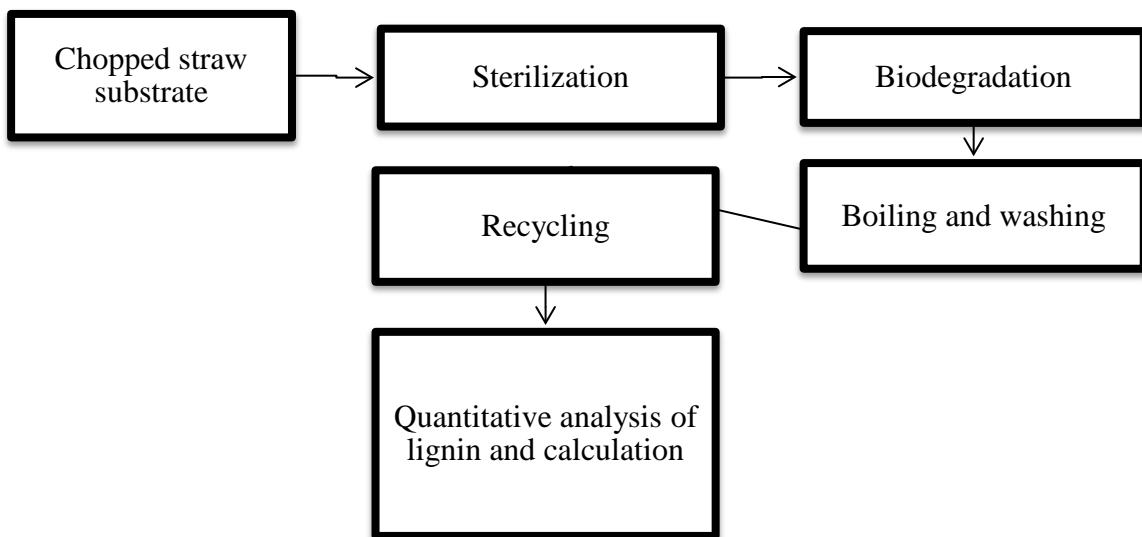
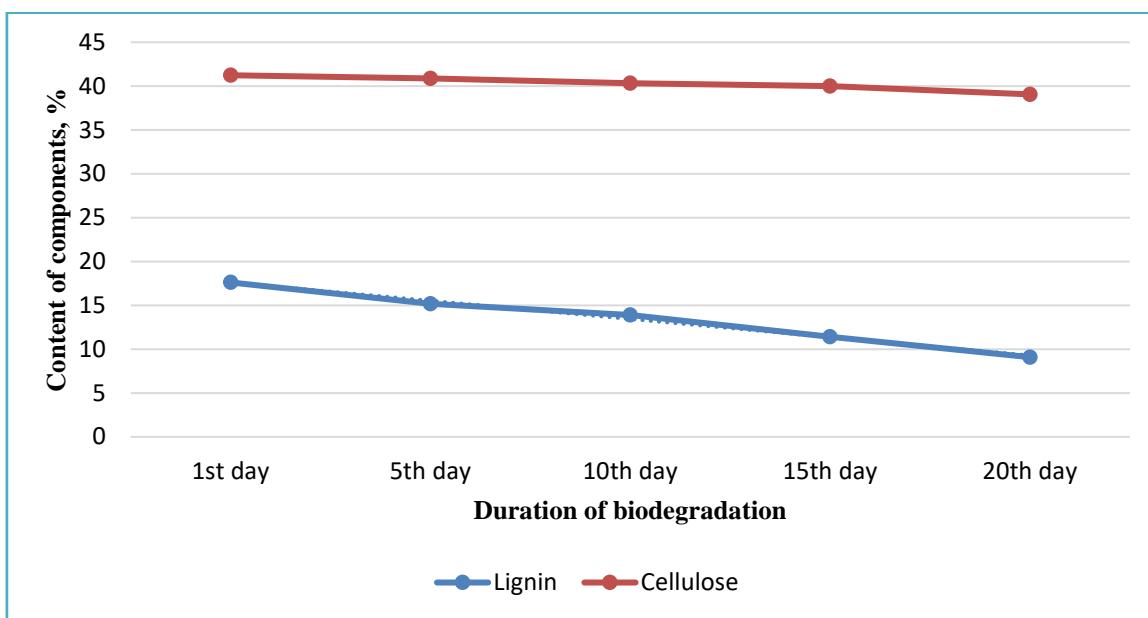


Figure 3 - Scheme of biodegradation of straw lignin

Samples were taken every 5 days and analyzed for residual lignin and cellulose. The results are illustrated in figure 4 and presented in table 1.

Figure 4 - Monitoring the amount of lignin and cellulose of straw during biodegradation by *S. commune* culture for 20 daysTable 1 - Monitoring of the amount of lignin and cellulose of straw during biodegradation by *S. commune* culture for 20 days

Cultivation time, days	Lignin content, %	Cellulose content, %
1	17.61	41.24
5	15.19	40.88
10	13.91	40.34
15	11.43	40.02
20	9.09	39.06

Studying table 1, we can conclude that the biodegradation of straw lignin by *S. commune* culture is possible, while due to the addition of an excess source of carbohydrate in the form of a glucose solution, the cellulose remains practically untouched.

In addition to quantitative methods of analysis for the residual amount of lignin, images were taken on a scanning electron microscope to assess the change in the structure of the straw before biodegradation (figure 5a) and after the biodegradation process (figure 5b).

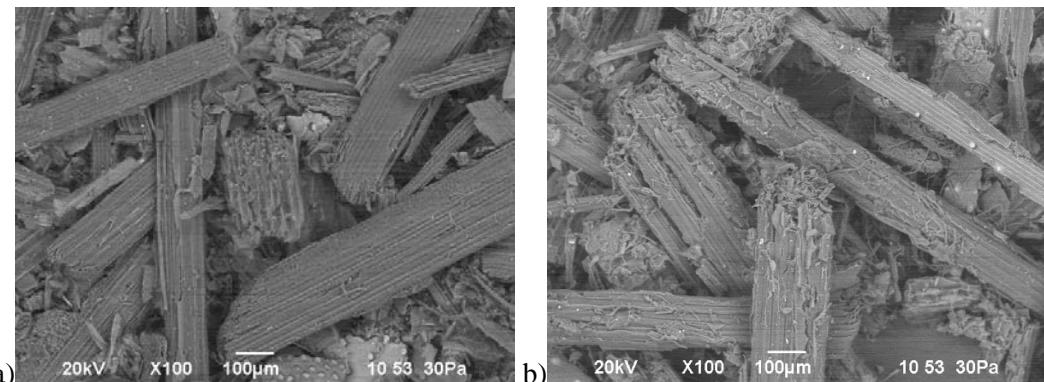


Figure 5 - Change in the structure of straw chips a) before biodegradation, b) after biodegradation

The figures show changes in the structure of the straw. If before the process of biodegradation by the *S. commune* fungus, the straw had a homogeneous integral structure, then after biodegradation, the structure of the straw became loose, heterogeneous, some sections were divided into smaller particles, which allows us to conclude that this wood-destroying fungus is able to break down lignin-cellulose bonds in straw.

Thus, it was found that in the control sample the lignin content was 17.61% by weight, by the end of degradation, on the 20th day - 9.09%, which is almost two times less than the initial amount. Also, the size of straw grinding - up to 45 microns - influenced the positive indicators of lignin biodegradation. The results obtained are optimistic, since in a similar scientific work with this microorganism culture, the authors managed to achieve straw lignin degradation by only 21% [14]. Accordingly, it can be concluded that this method of using the culture of *S. commune* in the pulp and paper production and processing of agricultural waste is relevant and promising.

Conclusion

The presented results of this work serve as evidence of the biodegradability of straw lignin by the culture of the wood-destroying fungus *S. commune*. According to the studies, on the 20th day of cultivation of the fungus at 25°C on straw crushed to 45 microns with the addition of glucose, the amount of lignin decreased from 17.61% to 0.09%. The biodegradation of lignin can generally replace the mechanical and chemical methods of pre-treatment of raw materials in pulp and paper production, which will significantly reduce the cost of expensive reagents and reduce the amount of harmful industrial emissions into the environment.

References:

- 1 Abd-Elsalam H.E., El-Hanafy A.A. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil. In: *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2009: Vol. 5, Issue 1. P. 39-44.
- 2 Atiresh G., Parrish C.C., Banoub J., Le T.T. Lignin degradation by microorganisms: A review. In: *Biotechnol. Prog.*, 2022: Vol. 38, Issue 2. (doi.org/10.1002/btpr.3226).
- 3 Beisl S., Friedl A., Miltner A. Lignin from Micro- to Nanosize: Applications. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 2017: Vol. 18, Issue 11. Art. ID 2367. (doi.org/10.3390/ijms18112367).
- 4 Chang A.J., Fan J., Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. In: *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2012: Vol. 72. P. 26–30.

- 5 Christopher L.P., Yao B., Ji Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. In: *Front. Energy Res.*, 2014: Vol. 2. (doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012)
- 6 Khan M.U., Ahring B.K. Anaerobic biodegradation of wheat straw lignin: The influence of wet explosion pretreatment. In: *Energies.*, 2021: Vol. 14, Issue 18. Art. ID. 5940. (doi.org/10.3390/en14185940)
- 7 Małachowska E., Dubowik M., Boruszewski P., Łojewska J., Przybysz P. Influence of lignin content in cellulose pulp on paper durability. In: *Sci. Rep.*, 2020: Vol. 10, Issue 1. Art. ID 19998. (doi.org/10.1038/s41598-020-77101-2)
- 8 Malik S., Rana V., Joshi G., Gupta P.K., Sharma A. Valorization of wheat straw for the paper industry: Pre-extraction of reducing sugars and its effect on pulping and papermaking properties. In: *ACS Omega*, 2020: Vol. 5, Issue 47. P. 30704–30715. (doi.org/10.1021/acsomega.0c04883)
- 9 Muhammad Irshad. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state medium banana stalks. In: *Afr. J. Biotechnol.*, 2011: Vol. 10, Issue 79. (doi.org/10.5897/AJB11.2242)
- 10 Ververis C., Georgiou K., Danielidis D., Hatzinikolaou D.G., Santas P., Santas R., Corletti V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. In: *Bioresour. Technol.*, 2007: Vol. 98, Issue 2. P. 296–301. (doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.007)
- 11 Wang Lei, Wang Wangui, Ji Xiang, Cai Lu. Biodegradation of lignin by the white rot fungus *Polyporus varius* and its promising potential for biopulping. In: *Renew. Energy Environ.: Int. Conf. Mater.* -Shanghai, 2011: P. 464–468.
- 12 Xiong Y., Zhao Y., Ni K., Shi Y., Xu Q. Characterization of ligninolytic bacteria and analysis of alkali-lignin biodegradation products. In: *Pol. J. Microbiol.*, 2020: Vol. 69, Issue 3. P. 339–347. (doi.org/10.33073/pjm-2020-037)
- 13 Xu G., Wang X., Hu J. Biobleaching of wheat straw pulp using laccase and xylanase. In: *BioResources*, 2013: Vol. 8, Issue 3. P. 3181–3188.
- 14 Kumar V. P., Sridhar M., Rao R. G. Biological depolymerization of lignin using laccase harvested from the autochthonous fungus *Schizophyllum commune* employing various production methods and its efficacy in augmenting in vitro digestibility in ruminants. In: *Scientific Reports*, 2022. Vol. 1, Issue 12. Art. ID 11170. (doi.org/10.1038/s41598-022-15211-9).

FTAMP: 34.27.00

Ә.Т. АХМЕТКЕРИМ*, Д.К. КИРБАЕВА, А.К. САДВАКАСОВА, Б.К. ЗАЯДАН,
Н.Р. АКМУХАНОВА, М.О. БАУЕНОВА, Ф.К. САРСЕКЕЕВА
әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы, Қазақстан
*e-mail: aigerim.akhmetkerim@mail.ru

МИКРОБАЛДЫР *SCENEDESMUS OBLIQUUS* SP. B7 ШТАМЫНЫҢ ӨСҮІ МЕН ӨНІМДІЛІГІНЕ ТҮЗ КОНЦЕНТРАЦИЯЛАРЫНЫҢ ӘСЕРІ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.09

Түйін

Коректік орта микробалдырлардың клеткаларының тіршілік өрекеті кезіндегі зат алмасу процестерін, энергия алмасуын қамтамасыз ететін, сондай-ақ өсуге маңызды элементтерді қамтитын субстрат. Микробалдырлардың коректік ортасын өзгерту арқылы, олардың клеткаларының өсу көрсеткіштерін және химиялық құрамын өзгертуге болады. Бұл жұмыста микробалдыр *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штамының өсу ортасына, яғни Прата коректік ортасына қосымша қосылған натрий хлордың (NaCl) 2,5 г/л және 15 г/л аралықтағы концентрацияларын қосып, бұл орталарда өскен *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штамының өсу көрсеткіштері, биомасса құрамындағы пигменттер (хлорофилл a, b) мен липидтердің мөлшері зерттелді.

Бұл нәтижелер бойынша, бақылаумен салыстырыланда *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штамының өсу динамикасы мен бірқатар пигменттер құрамының жиналуды NaCl-дың 10 г/л оңтайлы болып табылса, ал керісінше липидтердің мөлшері NaCl-дың 15 г/л-де ең жоғары мөлшерде жиналғаны анықталды. Мұндағы, өсу тығыздығы бақылаумен салыстырыланда NaCl-дың 10 г/л -де 80% - ға өскен болса, хлорофилл a және b көрсеткіштері 2,2 және 3 есеге дейін жоғарлағаны белгіленді. Ал, тәжірибедегі бақылаумен және басқа нұсқалармен салыстырыланда NaCl-дың 15 г/л концентрациясындағы биомасса құрамында липидтердің мөлшері 2,52 ессе жоғарлағаны анықталды. Бұл көрсеткіштерден микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штаммының бізбен алынған тұздың жоғарғы концентрациясында (10 г/л) клеткаларының өсімі мен бейімделгіштігінің жоғары екенін көрсетеді.

Кілтті сөздер: *Scenedesmus obliquus*, коректік орта, тұздылық, пигменттер, липидтер.

Микробалдырлардың биомассасы көптеген өнеркәсіптік салалар үшін, әсіресе фотосинтездік пигменттер, липидтер және т.б. биологиялық белсенді заттар (ББЗ) көзі ретінде көптеп өсіру жағынан басымдылығы жоғары нысаналар қатарына жатады.

Соңғы кездерде микробалдыр *Scenedesmus* туысты тұщы су микробалдырларына деген үлкен қызығушылық күннен күнге ұлғаюда. Себебі, *Scenedesmus* туысты микробалдырлардың көптеген түрлері коректік орта құрамына қарай өсу көрсеткіштерін, соның ішінде биомассаның жалпы өсуіне байланысты клеткалардағы органикалық қосылыстардың сапалық және сандық құрамын өзгерту қабілетіне ие [1-3]. Сондықтан адамзат тіршілігіне қажетті құндылығы жоғары метаболиттерді өндіру мүмкіншіліктеріне қарай кейбір *Scenedesmus* туысты микробалдырлардың өкілдерін биотехнологиялық маңызды нысана ретінде қарастыруға толық негіздер бар [4-6].

Микробалдырлардың қарқынды даму кезеңдеріне олардың жасушаларында пигменттер концентрациясының жоғарылауы сәйкес келеді [7]. Бұл микробалдырлардың өнімділігін хлорофиллдердің, липидтердің концентрациясы бойынша бағалауға мүмкіндік береді [8, 9].

Әртүрлі сипаттағы стресс жағдайында өсуге қабілеттілігі мен жоғары бейімделу белсенділігінің арқасында біржасушалы микробалдырлар көп мөлшерде пигменттерді (каротиноидтар, хлорофилл және т.б.) синтездеуге қабілетті болса, ал липидтерінің метаболизміне әсер ететін факторлардың бірі - бұл ортаның тұздылығы маңызды болып табылады [10-12]. Коректік ортадағы натрий хлор тұзының белгілі бір жеткілікті мөлшерінің өзінен микробалдырлар мембранныарының қалыпты болуына, олардың

ферменттерінің белсенділігінің ұлғаюына, клеткаларының бөлінуі, көміртектің ассимиляциясы, ақуыздар мен нуклеин қышқылдарының метаболизмі, тыныс алу қарқындылығының өзгеруі сиякты өмірлік функциялардың өзгерісіне әкелген мәліметтерді көп кездестіруге болады [13].

Микробалдыр клеткалары негізінен бірнеше физиологиялық және молекулалық процестер арқылы тұз концентрациясының белгілі бір өзгерістеріне шыдай алады. Метаболикалық жүйенің бұл динамикалық өзгеруі биомасса құрамына әсер етеді. Бірқатар зерттеулер тұшы су микробалдырларының өсу фазасында қолданылатын төмен тұздылық биомассаның максималды жиналудың ықпал ететін көрсетті. Микробалдырлардың тұздардың жоғары концентрациясына төтеп беру қабілеті көптеген зерттеулермен расталады [14].

Жоғарыда айтылған мәліметтерді ескере ортырып, тәжірибелік зерттеулеріміздің мақсаты микробалдыр *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штамының өсу көрсеткіштері мен биомасса құрамындағы құрделі фотосинтездік процеске қатысатын хлорофилл көздері мен жасушалық процестердің энергиямен қамтамасыз ететін липидтердің жиналуды көрсеткіштеріне қоректік ортадағы әртүрлі концентрациялы натрий хлордың әсерін зерттеу болып табылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу объектісі ретінде әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің фототрофты микроорганизмдер коллекциясынан алынған *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штаммы қолданылды. Аталған микробалдыр штаммын дақылдауда модификацияланған Прата сүйік қоректік ортасы қолданылды. Тәжірибеде стандартты Прата қоректік ортасының құрамына қосымша NaCl-дың төрт концентрациярын (2,5; 5,0; 10; 15 г/л) қосып, 3500 люкс жарықта, 25 °C температурада *Scenedesmus obliquus* sp. B7 штаммы өсірілді.

Штамм культурасының клеткалық тығыздығы фотометр КФК-3-«ЗОМЗ» көмегімен 760 нм-де оптикалық тығыздықты (D) тіркеу арқылы күнделікті бақыланды. Барлық талдаулар үш қайталамамен жасалды және орташа мәні алынды.

Дақылдардағы микробалдырлар биомассасының ұлғаюын анықтау үшін аликвоттар тесік диаметрі 0,85–0,95 мкм болатын мембраналық сұзгілерінде сұзіліп, 60°C температурада тұрақты салмаққа дейін кептірілді.

Пигменттердің (хлорофилл a және b) сандық құрамы 80% ацетон сығындысында анықталды [15]. Құрамындағы каротиноидтың концентрацияларының оптикалық тығыздығы Specord UV-VIS спектрофотометрде(420, 470 нм толқын ұзындығында) елшеннеді.

Липидтер хлороформ-изопропанол қоспасымен (1:1 көлемі бойынша) биомассадан алынғаннан кейін гравиметриялық әдіспен анықталды [16].

Тәжірибе барысында микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штамының өсуіне қолайлы Прата қоректік ортасын модификациялау үшін тұздың әртүрлі концентрациялары алынған жұмыстар жүргізілді.

Тәжірибеле алынған зерттеу нұсқалары:

Бақылау (стандартты Прата қоректік ортасы)

Бірінші нұсқа: 2,5 г/л NaCl;

Екінші нұсқа: 5,0 г/л NaCl;

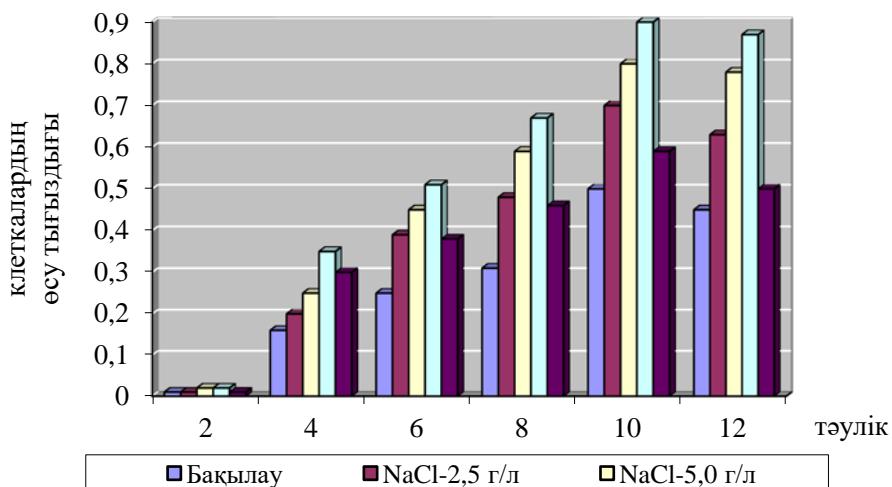
Үшінші нұсқа: 10 г/л NaCl;

Төртінші нұсқа: 15 г/л NaCl.

Зерттеу иттихаддері және талқылау

Зерттеу барысында тәжірибеле алынған микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штамының клеткаларының өсу тығыздығы лабораториялық жағдайда 10 тәулік бойы бақыланды (сурет 1). Бұл зерттеулерден байқағанымыздай, тәжірибенің екінші тәулігінде *S. obliquus* sp. B7 штамының өсуі бақылауда 0,16-ге көтерілсе, тәжірибеле алынған NaCl тұзының әртүрлі

концентрацияларында (2,5 г/л - 0,2; 5 г/л - 0,25; 10 г/л - 0,35;) өсу көрсеткіштерінің жоғарлағаны байқалса, микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штаммының өсу динамикасы 15 г/л - де 0,3 шамасында баяу өскені белгіленді. Ал, 6-шы тәулікте, бақылауда клетканың тығыздық көрсеткіші 0,31-ге дейін жоғарыладап, NaCl-дың әртүрлі концентрациясында клеткалардың өсу тығыздығы мынадай көрсеткіште болды: 2,5 г/л - 0,48; 5,0 г/л - 0,59; 10 г/л - 0,67; 15 г/л - 0,46. Келесі 10-шы тәулікте бақылаудадағы клетканың өсүі 0,5-ке келіп өсүін тоқтатқан болса, тәжірибеміздегі NaCl-дың 2,5 г/л концентрациясында клетканың өсүі 0,7-ге дейін жетіп, NaCl-дың 5,0 г/л концентрациясында *S. obliquus* sp. B7 штаммының клеткаларының оптикалық тығыздығы 0,8 шамасында болғандығы анықталынған. Ал, тұздың 10 г/л концентрациясында клетканың өсүі 0,9-ге жоғарыладап, NaCl-дың 15 г/л концентрациясында 0,59 шамасында өсүін тоқтатқан.



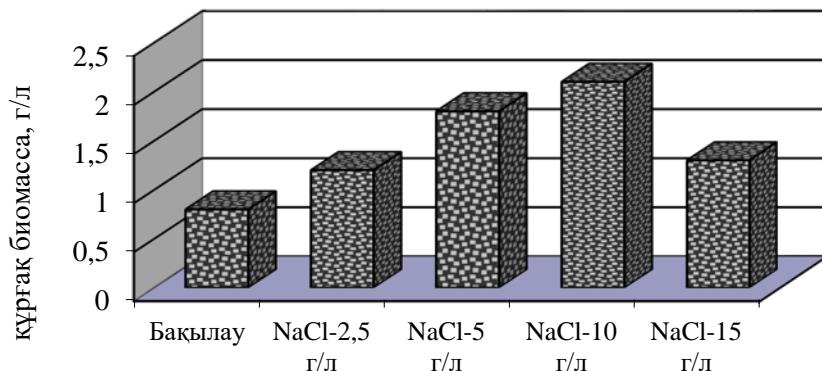
Сурет 1 – Тұздың әртүрлі концентрацияларында өсірілген *S. obliquus* sp. B7 штаммының өсу тығыздығы

Қорытындылай келе, зерттеудің 10-шы тәулігінде *S. obliquus* sp. B7 штаммының өсу тығыздығы бақылаумен салыстырғанда тұздың 2,5 г/л – де 40% - ға; 5 г/л – де 60% - ға; 10 г/л – де 80% - ға дейін жоғарлағаны анықталса, ал бұл кезде бақылаумен және тәжірибедегі басқа нұсқалармен салыстырғанда тұздың 15 г/л концентрациясындағы өскен микробалдырдың өсу тығыздығы 18% - ға төмендегені белгіленді.

S. obliquus sp. B7 штаммының өсу тығыздығына NaCl-дың 2,5 және 10 г/л концентрациясына дейін оңтайлы әсер етіп, бақылаумен салыстырғанда өсу көрсеткіштері жоғарлағаны анықталды. Ал, керісінше, NaCl – дың 15 г/л концентрациясы *S. obliquus* sp. B7 штаммының өсу көрсеткіштеріне кері ықпалын тигізіп, яғни тұздың шамадан тыс мөлшерде болуынан клеткаларының өсүі мен тежелуі тез болғанын байқадық. Бұл клеткалық протеазалар мен эндонуклеаза ферменттерін ынталандыратын электролиттің ағып кетуіне байланысты болуы мүмкін [17].

Тұздың бастапқы деңгейлерінде өсу көрсеткіштерінің жоғарылауының себебі, стандарты Прата қоректік ортасында тұздың жетіспеушілігі әсерінен микробалдырдың өсу көрсеткіштері біршама төмен болды, сондықтан қоректік орта құрамына тұздың әртүрлі концентрацияларын қосу нәтижесінде, тұздың жоғары дәрежеде әсер етуіне байланысты болуы мүмкін. Сонымен бірге, тәжірибе барысында сусpenзияның өсу динамикасымен бірге, NaCl – дың әртүрлі концентрацияларында *S. obliquus* sp. B7 штаммы қаншалықты өзіне биомасса мөлшерін жинағандығы қадағаланды, оны 2-суреттен көруге болады.

2-суреттен көріп тұрғанымыздай, тәжірибелің соңғы тәулігінде бақылау нұсқасында 0,8 г/л биомасса жиналған болса, бірінші және екінші нұсқаларда сәйкесінше 1,2 г/л және 1,8 г/л биомассаның мөлшері жоғарлаганы анықталды.



Сурет 2 – Тұздың әртүрлі концентрацияларында өскен *S. obliquus* sp. B7 штаммының құрғақ биомассасының жиналуда көрсеткіштері

Биомассаның ең жоғары жинақталуы үшінші нұсқада 2,1 г/л болып, жоғары өнімділік деңгейін көрсетсе, ал төртінші нұсқада биомасса мөлшері 1,3 г/л шамасына дейін төмендегені белгіленді. Байқағанымыздай, *S. obliquus* sp. B7 штаммының құрғақ биомассасы қоректік ортаға 10 г/л NaCl қосымша қосылғанда жоғары көрсеткішті көрсеткені анықталды. Осылайша, бақылаумен (0,8 г/л) салыстырғанда биомасса жинақталуы бірінші нұсқада 1,5 есе, екінші нұсқада 2,3 есе, үшінші нұсқада 2,6 есе жоғарлағаны белгіленсе, ал төртінші нұсқада 1,6 есе артқаны анықталынды.

Тұздың бастапқы концентрацияларында бақылаумен салыстырғанда биомасса көрсеткіштері жоғары болды. Бұлай болу себебі, микробалдырылардың тұздың бастапқы концентрацияларына бейімделу механизмінің артуы деп болжануда. Төртінші нұсқа нәтижелері біршама төмендегенін байқадық, яғни микробалдырылардың жоғары тұз мөлшерінің әсерінен биомассасы төмендеді, бұлай болу себебі микробалдырылар су қысымын ұстап тұру үшін энергияны жұмсады және бұл өнімділіктің төмендеуіне немесе өсудің төмендеуіне әкеледі деп болжануда. Нәтижесінде, бұл зерттеуімізде де өсу тығыздығы сияқты биомасса жиналуды бойынша ең жақсы көрсеткіш 10 г/л NaCl нұсқада екендігі анықталды.

Кейінгі зерттеулерімізде, *S. obliquus* sp. B7 штаммының құрғақ биомассаларының құрамындағы биологиялық белсенді заттар көрсеткіштері (хлорофилл *a* және *b*) анықталды (кесте 1).

Кесте 1 – Тұздың әртүрлі концентрациясында өсірілген *S. obliquus* sp. B7 штаммы биомассасындағы хлорофилл көрсеткіштері

Зерттеуге алынған нұсқалар	МГ/Г	
	хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>
Бақылау	1,17 ± 0,04	0,64 ± 0,02
NaCl 2,5 г/л	1,59 ± 0,06	0,93 ± 0,03
NaCl 5 г/л	1,98 ± 0,08	1,32 ± 0,04
NaCl 10 г/л	2,62 ± 0,11	1,95 ± 0,07
NaCl 15 г/л	1,36 ± 0,05	1,76 ± 0,06

Зерттеудегі бақылаумен (хлорофилл а - 1,17 мг/г, хлорофилл b - 0,64 мг/г) салыстырғанда, NaCl 2,5 г/л-де өсken *S. obliquus* sp. B7 штаммының хлорофилл a - 1,59 мг/г, хлорофилл b - 0,93 мг/г (1-кесте) мөлшерін құрады. Ал, бұл кезде NaCl 5,0 г/л нұсқадағы хлорофилл a және b көрсеткіштері 1,98 және 1,32 мг/г шамасында болып, NaCl 10 г/л нұсқада хлорофилл a және b көрсеткіші 2,62 мг/г және 1,95 мг/г мөлшерін көрсете келе ең жоғары нәтижени белгілесе, NaCl 15 г/л нұсқадағы хлорофилл a және b мәндері 1,36 мг/г және 1,76 мг/г жеткені анықталды.

Қорытындылай келе, бақылаумен салыстырғанда (хлорофилл a - 1,17 мг/г, b - 0,64 мг/г) хлорофилл көрсеткіштері бірінші нұсқада 1,3 және 1,5 есе, екінші нұсқада 1,7 және 2,1 есе, үшінші нұсқада 2,2 және 3 есе мөлшері жоғарылау нүктесіне келіп, төртінші нұсқада 1,2 және 2,7 есе артқандығы анықталды.

Біздің зерттеуімізде бақылаумен салыстырғанда алынған тұздың барлық концентрациясының хлорофиллдері a және b мөлшерінің жоғарылағаны анықталды, мұндай нәтиженің болу себебі, тұздың фотосинтезі жеңілдету үшін қажет натрий иондарын қамтамасыз ететін қасиетіне, хлоропласт мембраннының дамуына ықпал етуі деп болжануда. Сондай – ақ, кейбір ғылым зерттеулерде сипатталғандай, микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штаммының биомасса құрамындағы a және b хлорофилл пигменттерінің артуы қоректік ортадағы натрий хлор тұзына микробалдыр дақылдарының бейімделгіштігі мен олардың клеткаларындағы метаболиттік процеске аса қажеттілдігімен байланыстырады [18].

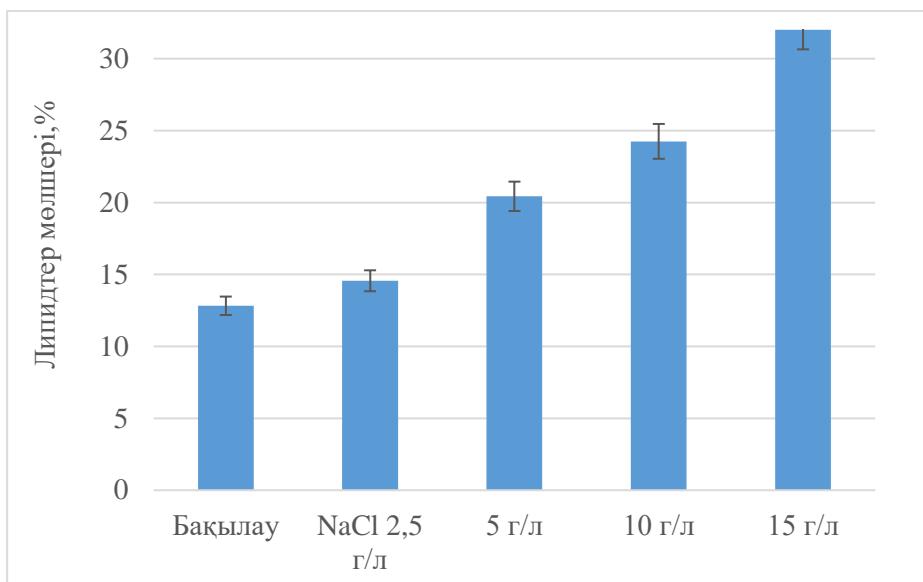
Кейінгі зерттеулерде, микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штаммының клетка құрамындағы жалпы липидтерге NaCl-дың әртүрлі концентрацияларының әсерін бақылады (сурет 4).

Бақылауда және тұздың әр түрлі концентрациялы биомассаларындығы липидтердің көрсеткіштері келесідей нәтижелер берді: бақылауда – 12,82%, натрий хлордың 2,5 және 5,0 г/л концентрацияларында липидтердің мөлшері 14,56 және 20,43% -ға артқандығы анықталса, ал тұздың 10 және 15 г/л концентрацияларында липидтердің мөлшері 24,25 және 32,26% -ға жетіп жоғарлағаны анықталды.

NaCl концентрациясы мен липидтердің құрамы арасында сенімді корреляция байқалды. Осылайша, липидтердің жоғары мөлшері NaCl жоғары концентрациясында байқалды, бұлай болу себебі, тұз мөлшері және қоректік ортадағы азот тапшылығымен байланысты болуы мүмкін. Тұздың жоғары концентрациясы липидтердің өнімділігін арттыратындығы Панча және т.б. авторлардың еңбектерінде де белгіленгендей, *Scenedesmus* sp. штаммы жоғары тұздылық жағдайында липидтердің жиналуын арттырады. Сондай ақ, қолайсыз немесе өсу жағдайы шектеулі (стресстік жағдайда) орталарда микробалдырлардың бейтарап липидтері биомассада липидті тамшылар түрінде жиналады және олар цитоплазма мен жасушаның негізгі қосалқы компоненттері болып табылады [19].

Нәтижесінде, зерттеу барысында бақылаумен (12,82 г/л) салыстырғанда липидтер мөлшері бірінші нұсқада (2,5 г/л NaCl) 1,1 есе, екінші нұсқада (5,0 г/л NaCl) 1,6 есе, үшінші нұсқада (10 г/л NaCl) 1,9 есе жоғарлағаны анықталып, төртінші нұсқада (15 г/л NaCl) 2,52 есе артқаны белгіленді.

Натрий хлордың ең жоғары мөлшері (15 г/л) қосылған ортада өсken биомассаның құрамында жалпы липидтердің мөлшері көптеп жинақталғаны анықталды. Бұл липидтердің өнімділігі микробалдырлардың биомассасына және липидтердің құрамына тікелей пропорционалды екенін білдіреді. Алайда, липидтердің құрамы биомассаның құрамына тәуелді емес, яғни биомассаның көбеюі липидтердің құрамын айтартылғатай арттырмайды [19].



Сурет 3 – Микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штаммының құрамындағы липидтердің жиналу мөлшері, %

Бұл тәжірибелік зерттеулерден NaCl-дың жоғары концентрациясында липидтердің жиналу мөлшерінің жоғары болуына қарап, *S. obliquus* sp. B7 штаммының липидтерді өндіруде тиімді екенін айтуға болады. Бұлай болу себебі, микробалдырлар клеткаларында бейтарап липидтердің көбеюі микробалдырлар клеткаларында осмостық қысымның жоғарылауына жауап беруге және NaCl жоғары концентрациясында жасуша мембранасының сұйықтығы мен тұтастығын сақтауға мүмкіндік беретін бейімделу механизмі болуы мүмкін. Сондықтан микробалдырлардың тіршілік әрекеті мен өнімділігіне, зат алмасу процесстері мен көбеюін қамтамасыз ету үшін маңызды болып табылатын қоректік ортаға қосымша қосылған тәжірибелік зерттеудегі NaCl элементінің жоғары маңыздылығын атап өттеге болады.

Қорытынды

Тәжірибедегі микробалдыр *S. obliquus* sp. B7 штаммының өсу ортасына қосымша натрий хлор тұзының әртүрлі концентрацияларын қосып өсірілген ортадағы (10 тәулік бойы) жасушалардың өсу тығыздығы анықталды, бұл нәтижелер бойынша: бақылаумен салыстырғанда, натрий хлордың 2,5 г/л концентрациясында өскен микробалдырдың өсу тығыздығы 40% - ға жоғарласа; ал натрий хлордың 5 г/л концентрациясында бұл көрсеткіш 60% - ға; 10 г/л концентрациясында 80% - ға дейін жоғарлағаны анықталса, келесі натрий хлордың 15 г/л концентрациясындағы өскен микробалдырдың өсу тығыздығы 18% - ға төмендегені белгіленді.

Тәжірибе барысында бақылаумен салыстырғанда (хлорофилл *a* - 1,17 мг/г, *b* - 0,64 мг/г) хлорофилл көрсеткіштері бірінші нұсқада 1,3 және 1,5 есе, екінші нұсқада 1,7 және 2,1 есе, ушінші нұсқада 2,2 және 3 есе мөлшері жоғарылау нұктесіне келіп, төртінші нұсқада 1,2 және 2,7 есе артқандығы анықталды.

Тәжірибедегі микробалдыр биомассасындағы жалпы липидтердің мөлшері анықталды. Бұл зерттеулерден бақылаумен салыстырғанда (липидтер - 12,82 %) NaCl-дың 2,5 және 5,0 г/л концентрацияларында өскен биомассадағы липидтердің мөлшері (липидтер 14,56 және 20,43%) жоғарлап, яғни 1,1 және 1,6 есеге жоғарлаған болса, ал бұл көрсеткіш NaCl 10 және 15 г/л концентрацияларында (липидтер 24,25 және 32,26%) 1,9 және 2,52 есеге жоғарлағаны анықталды.

Қаржыландыру

Бұл зерттеуді Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігі қаржыландырды (грант №АР09260077, №АР14972916).

Әдебиеттер:

- 1 Fodorpataki L., Bartha C. Salt stress tolerance of a freshwater green alga under different photon flux densities. *Stud. U.B.B. Biol.*, 2004, 49: 85–93.
- 2 Карякин Д.О. Оптимизация питательной среды для культуры *Scenedesmus sp.* / Д.О. Карякин, Н.В. Мальцевская, М.В. Новичева [и др.] // *Международный научно-исследовательский журнал*, 2017, №8(62) (doi: 10.23670/IRJ.2017.62.081).
- 3 Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем // *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 2009, 20: 120–133.
- 4 Romanenko E.A., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.A. Phytohormones of microalgae: Biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt I. Auxins, Abscisic Acid, Ethylene. *IJA*, 2015, 17(3): 275-289.
- 5 Дмитрович Н.П. Влияние физиологического состояния микроводорослей на соотношение в их клетках различных пигментов / Н.П. Дмитрович, Т.В. Козлова // *Вестн. Полес. гос. ун–та. Сер. прир. наук*, 2015, 1: 40–43.
- 6 Anand V., Kashyap M., Samadhiya K., Ghosh A., Kiran B. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus* : a biodiesel trigger. *Biomass Bioenergy*, 2019, 127: 105252 (doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.05.021).
- 7 Gaubert J., Payri C.E., Vieira C., Solanki H., Thomas O.P. High metabolic variation for seaweeds in response to environmental changes: a case study of the brown algae *Lobophora* in coral reefs, 2019, 993(9): 1–12 (doi.org/10.1038/s41598-018-38177-z).
- 8 Lartigue J., Neill A., Hayden B.L., Pulfer J., Cebrian J. The impact of salinity fluctuations on net oxygen production and inorganic nitrogen uptake by *Ulva lactuca* (*Chlorophyceae*). *Aquat. Bot.*, 2003, 75: 339–350.
- 9 Romanenko E.A., Romanenko P.A., Babenko L.M., Kosakovskaya I.V. Salt stress effects on growth and photosynthetic pigments' content in algoculture of *Acutodesmus dimorphus* (*Chlorophyta*). *Int. J. Algae*, 2017, 19: 271–282.
- 10 С. Ломадзе, Р. Кабиров, Е. Пурина, Л. Сафиуллина, А. Иванова. Воздействие солей натрия на микроскопическую зеленую водоросль *Scotiellopsis rubescens* // Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики». Серия: Естественные и технические науки, 2018, 7: 14–17.
- 11 Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*, 2014 (doi: 10.1155/2014/701596).
- 12 Lawton R.J., De Nys R., Magnusson M.E., Paul N.A. The effect of salinity on the biomass productivity, protein and lipid composition of a freshwater macroalga. *Algal Research*, 2015: 213-220 (doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.001).
- 13 Bleakley S., Hayes M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 2017, 6(5): 33 (doi.org/10.3390/foods6050033).
- 14 Д.Н. Павловна, К.А. Сергеевна, С.Н. Анатольевна. Влияние питательной среды и интенсивности барботажа на динамику физиологических параметров роста хлореллы // *Вестник Полесского государственного университета. Серия природоведческих наук*, 2016, 2: 13-18.
- 15 Жила Н.О., Калачёва Г.С., Волова Т.Г. Влияние солености среды на рост и биохимический состав зеленой микроводоросли *Botryococcus braunii* KüTZ IPPAS H-252 // Журнал СФУ. Биология, 2011, 4(3): 229–242.
- 16 Na Liu, Yiwen Mou, Kunyang Su, Xue Li, Tianxiang Lu, Wenbao Yan, Mingming Song, Ze Yu. The effect of salinity stress on the growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* FACHB-1297 under xylose mixotrophic cultivation. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 165: 887-894, ISSN 0957-5820 (doi.org/10.1016/j.psep.2022.07.051).
- 17 Elloumi W., Jebali A., Maalej A., Chamkha M., Sayadi S. Effect of mild salinity stress on the growth, fatty acid and carotenoid compositions, and biological activities of the thermal freshwater microalgae *Scenedesmus* sp. *Biomolecules*, 2020, 10: 1515 (doi.org/10.3390/biom10111515).

18 Pancha I., Chokshi K., Mishra S. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol.*, 2015, 179: 565–572 (doi:10.1016/j.biortech. 2014.12.079).

19 Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.*, 2015, 102 (3): 3071–3076.

А.Т. АХМЕТКЕРИМ*, Д.К. КИРБАЕВА, А.К. САДВАКАСОВА, Б.К. ЗАЯДАН,
Н.Р. АКМУХАНОВА, М.О. БАУЕНОВА, Ф.К. САРСЕКЕЕВА

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: aigerim.akhmetkerim@mail.ru

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛИ НА РОСТ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *SCENEDESMUS OBLIQUUS* SP. B7

Аннотация

Питательная среда представляет собой субстрат, обеспечивающий обменные процессы, энергетический обмен при жизнедеятельности клеток микроводорослей, а также включающий важные для роста элементы. Изменяя питательную среду микроводорослей, можно изменить показатели роста и химический состав их клеток. В этой работе изучены показатели роста штамма *Scenedesmus obliquus* sp. B7, пигментов в биомассе (хлорофилл a, b) и общего количества липидов с добавлением хлорида натрия в концентрациях от 2,5 г/л до 15 г/л в питательную среду Прата для культивирования этого штамма.

По результатам исследований, динамика роста штамма *Scenedesmus obliquus*. sp B7 и накопление ряда пигментов были оптимальными при концентрации NaCl - 10 г/л, а общее содержание липидов было максимальным – при 15 г/л, установлено, что, если плотность роста увеличилась на 80% в 10 г/л NaCl по сравнению с контролем, то показатели хлорофилла a и b увеличились в 2,2 и 3 раза. По сравнению с экспериментальным наблюдением обнаружено, что содержание общих липидов в биомассе при добавлении в питательную среду 15 г/л NaCl увеличилось в 2,52 раза. Из этих показателей следует, что штамм микроводоросли *Scenedesmus obliquus* sp. B7 демонстрирует высокий рост и адаптируемость клеток при концентрации NaCl в питательной среде 10 г/л.

Ключевые слова: *Scenedesmus obliquus*, питательная среда, соленость, пигменты, липиды.

IRSTI: 34.27.00

А.Т. АХМЕТКЕРИМ*, Д.К. КИРБАЕВА, А.К. САДВАКАСОВА, Б.К. ЗАЯДАН,
Н.Р. АКМУХАНОВА, М.О. БАУЕНОВА, Ф.К. САРСЕКЕЕВА

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: aigerim.akhmetkerim@mail.ru

THE EFFECT OF SALT CONCENTRATION ON THE GROWTH AND PRODUCTIVITY OF MICROALGAE STRAINS *SCENEDESMUS OBLIQUUS* SP. B7

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.09

Abstract

Nutrient medium is a substrate that provides metabolic processes during vital activity of microalgae cells, energy metabolism, and elements essential for microalgae growth. It is possible to alter the growth indicators and chemical composition of microalgae cells by changing the components of nutrient medium. In these studies, growth indicators, chlorophyll (a, b) and total lipid content in the biomass of *Scenedesmus*

obliquus sp. B7 strain grown on Prata medium with the addition of sodium chloride concentrations in the intervals of 2.5 g/l and 15 g/l were evaluated.

According to these results, compared with the observation, it was found that 10 g/l NaCl was optimal for the growth dynamics of *Scenedesmus obliquus* sp. B7 strain and accumulation of some pigment compositions. Nevertheless, the optimum value for the highest total lipid content was 15 g/l NaCl.

It was determined that the chlorophyll *a* and *b* indicators increased by 2.2 and 3 times, respectively, when the growth density was increased by 80% in 10 g/l NaCl compared to the control. In comparison with experimental observation and other variants, it was ascertained that the content of total lipids in biomass was 2.52 times higher when 15 g/l NaCl was added to the nutrient medium. It can be concluded from these indicators that the microalgae *Scenedesmus obliquus* sp. B7 strain shows a high level of growth and cell adaptability at a NaCl concentration of 10 g/l in the nutrient medium.

Keywords: *Scenedesmus obliquus*, culture medium, salinity, pigments, lipids.

Microalgal biomass has become one of the priority targets for several industry sectors, especially as a source of biologically active substances (BASs) such as photosynthetic pigments, lipids and others.

Interest in freshwater microalgae, the genus *Scenedesmus*, has recently increased. This is because many species of *Scenedesmus* microalgae have the ability to change growth indicators in response to the composition of the nutrient medium, including the qualitative and quantitative composition of intracellular organic compounds, depending on overall biomass growth [1-3]. Therefore, due to their ability to synthesize highly valuable metabolites that are essential for human life, representatives of some *Scenedesmus* related microalgae are considered to be substantial biotechnological targets. [4-6].

Periods of intense growth of the microalgae are associated with an increase in the concentration of pigment in their cells [7]. This allows the concentration of chlorophylls, lipids and other substances to be used to assess the performance of microalgae [8, 9].

Unicellular microalgae are able to synthesize large amounts of pigments (carotenoids, chlorophyll, etc.) due to their ability to grow under a wide range of stress conditions and high adaptive activity, and one of the factors that has an impact on lipid metabolism is the salinity of the medium, which is significant [10-12]. The presence of an adequate amount of sodium chloride in the culture medium has been shown to normalize the microalgae membrane, increase enzyme activity, and alter vital functions such as cell division, carbon assimilation, protein and nucleic acid metabolism, and respiration intensity. [13].

Through several physiological and molecular processes, microalgae cells can tolerate certain changes in salt concentration. This dynamic change in the metabolic system affects the composition of biomass. Numerous studies have demonstrated that the low salinity used during the growth phase of freshwater microalgae is conducive to the maximum accumulation of biomass. Numerous investigations have shown that microalgae can resist high salt concentrations. [14].

Considering the above information, the purpose of our experimental research is to determine the impact of salinity in different concentrations in the nutrient medium on the growth indicators of the microalgae *Scenedesmus obliquus* sp. B7 strain and the accumulation of lipids that provide energy to chlorophyll sources and cellular processes involved in the complex photosynthetic process in biomass.

Research materials and methods

Scenedesmus obliquus sp. B7 strain from Al-Farabi Kazakh National University phototrophic microorganism collection was used as research object. A modified Prata liquid culture medium was used to grow this microalgae strain. In the experiment, the *Scenedesmus obliquus* sp. B7 strain was grown under 3500 lux light, at a temperature of 25°C, with the addition of four concentrations of NaCl (2.5, 5.0, 10, 15 g/l) in addition to the standard Prata culture medium.

The cell density of the strain culture was monitored on a daily basis by recording the optical density (D) at 760 nm with the KFK-3 "ZOMZ" photometer. All analyses were performed with three replicates and the mean value was obtained.

To determine the algal biomass increase, microbial samples were filtered through 0.85 - 0.95 micron pore size membrane filters and dried at 60 °C to constant weight.

An 80% acetone extract was used to determine the quantitative content of pigments (chlorophyll *a* and *b*) [15]. The Specord UV-VIS spectrophotometer (at wavelengths of 420, 470 nm) was used to measure the optical density of the concentrations of carotenoids contained.

Lipids were determined by the gravimetric method after extraction from the biomass with a chloroform-isopropanol mixture (volume 1:1) [16].

During the experiment, various salt concentrations were obtained to modify the Prata nutrient medium suitable for the growth of the microalgae *S. obliquus* sp. B7 strain.

Experimental research options:

Control (standard of Prata culture medium)

First option: 2.5 g/l NaCl;

Second option: 5.0 g/l NaCl;

Third option: 10 g/l NaCl;

Fourth option: 15 g/l NaCl.

Results and Discussion

As part of the research, the cell growth density of the *S. obliquus* sp. B7 strain was monitored in the laboratory for 10 days (Figure 1). The results show that on day 2 of the experiment, the growth of the *S. obliquus* sp. B7 strain accelerated by 0.16, while at the different NaCl salt concentrations used in the experiment (2.5 g/l - 0.2, 5 g/l - 0.25 and 10g/l - 0.35), the growth dynamics of the *S. obliquus* sp. B7 strain slowly accelerated by approximately 0.3 at 15 g/l. On the 6th day, under control, the cell density indicator increased to 0.31, and at different concentrations of NaCl, the cell growth density was as follows: 2.5 g/l-0.48; 5.0 g/l-0.59; 10 g/l - 0.67; 15 g/l - 0.46. In our experiment, it was observed that at a concentration of 2.5 g/l of NaCl, the growth of the cell reached 0.7, and at a concentration of 5.0 g/l of NaCl, the optical density of the cells of the strain *S. obliquus* sp. B7 was about 0.8. This was the case when the growth of the control cell reached 0.5 during the following 10 days. Meanwhile, at a salt concentration of 10 g/l, cell growth increased by 0.9, and at a concentration of 15 g/l, NaCl stopped growth at about 0.59.

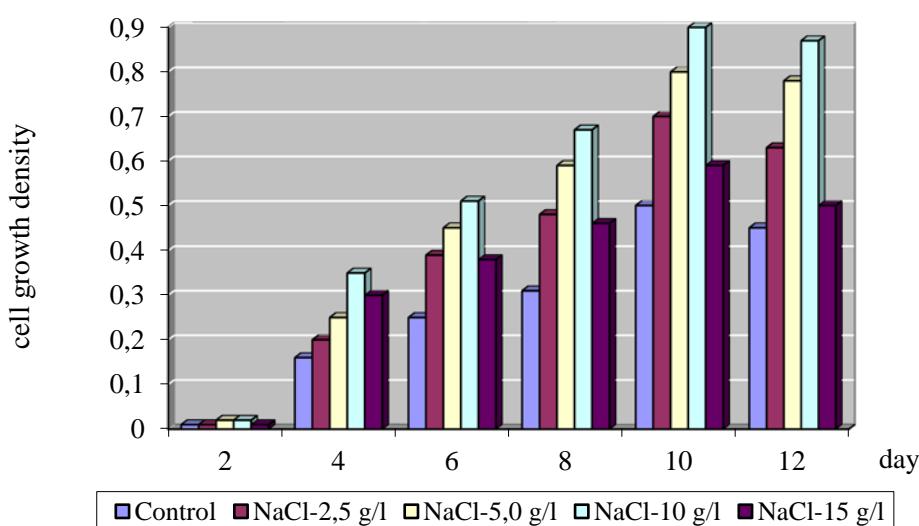


Figure 1 - Growth monitoring of *Scenedesmus obliquus* sp. B7 cultured in Modified Prata's Medium (control) and in MPM medium supplemented with 2.5, 5.0, 10 and 15 g/L of NaCl, by the measure of the optical density (OD) at 760 nm

The growth density of the strain *S. obliquus* sp. B7 increased by 40% in the salt concentration of 2.5 g/l, by 60% in the salt concentration of 5 g/l and by 80% in the salt concentration of 10 g/l on day 10 of the study. However, at this point, the growth density of the enhanced microalgae at a salt concentration of 15 g/l decreased by 18% compared to the control and other options in the experiment. The results showed that NaCl concentrations of 2.5 and 10 g/L had an optimal effect on the growth density of *S. obliquus* sp. B7 and increased the growth indicators compared to the control. On the contrary, we found that NaCl concentration of 15 g/l negatively affected growth indicators of *S. obliquus* sp. B7 strain, that is, excessive salt content accelerated cell growth and inhibition. This could be due to electrolyte leakage, which activates cellular enzymes called proteases and endonucleases [17].

The reason for the increase in growth rates at the initial salt levels was that the microalgae growth rates were somewhat lower due to the lack of salt in the standard Prata culture medium. Therefore, the addition of different salt concentrations to the culture medium may have resulted in a high degree of salt exposure.

The dynamics of the growth of the suspension was monitored throughout the experiment and the amount of biomass accumulated by the strain *S. obliquus* sp. B7 at different NaCl concentrations was also recorded, as shown in Figure 2.

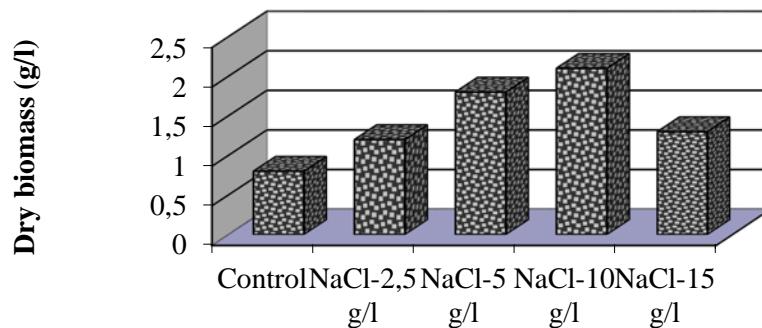


Figure 2 - Indicators of accumulation of dry biomass of strain *S. obliquus* sp. B7 grown at different salt concentrations

As can be seen from Figure 2, biomass increased by 1.2 g/l and 1.8 g/l in the first and second versions, respectively, compared to 0.8 g/l in the control version on the last day of the experiment. It was established that the highest biomass accumulation was 2.1 g/l in the third version, indicating a high level of productivity, and in the fourth version, the amount of biomass decreased to 1.3 g/l. As we have seen, it was found that the dry biomass of the strain *S. obliquus* sp. B7 showed a higher rate when 10 g/l NaCl was added additionally to the culture medium.

Thus, compared to the control (0.8 g/l), it was established that the accumulation of biomass in the first version increased by 1.5 times, in the second version-by 2.3 times, in the third version-by 2.6 times, and in the fourth version-by 1.6 times.

Biomass indicators were higher than the control at the initial salt concentrations. An increase in the adaptation mechanism of the microalgae to the initial salt concentrations is thought to be the reason for this. We noticed that the results of the fourth option decreased slightly, i.e. the microalgae biomass decreased because of the high salinity, which is the reason why microalgae consume energy to maintain water pressure, and it is assumed that this will result in reduced productivity or reduced growth. Consequently, this study also found that the best biomass accumulation rate, as well as growth density, was in the NaCl 10 g/l option.

In our subsequent studies, indicators of biologically active substances (chlorophyll *a* and *b*) in the composition of dry biomass of the strain *S. obliquus* sp. B7 were determined (Table 1).

Table 1 – Chlorophyll *a* and *b* indicators in the biomass of *S. obliquus* sp. B7 grown at different salt concentrations

Options taken in the study	mg/g	
	chlorophyll <i>a</i>	chlorophyll <i>b</i>
Control	1,17 ± 0,04	0,64 ± 0,02
NaCl 2,5 g/l	1,59 ± 0,06	0,93 ± 0,03
NaCl 5 g/l	1,98 ± 0,08	1,32 ± 0,04
NaCl 10 g/l	2,62 ± 0,11	1,95 ± 0,07
NaCl 15 g/l	1,36 ± 0,05	1,76 ± 0,06

In a study with a salt concentration of 2.5 g/l of *S. obliquus* sp. B7 strain, the total amount of chlorophyll *a* was 1.59 mg/g and chlorophyll *b* was 0.93 mg/g compared to the control (chlorophyll *a* - 1.17 mg/g and chlorophyll *b* - 0.64 mg/g, respectively) (Table 1). At the same time, it was found that the indicators of chlorophyll *a* and *b* in the NaCl 5.0 g/l version were around 1.98 and 1.32 mg/g, while the indicators of chlorophyll *a* and *b* in the NaCl 10 g/l version showed the highest results, indicating 2.62 mg/g and 1.95 mg/g, while the values of chlorophyll *a* and *b* in the NaCl 15 g/l version reached 1.36 mg/g and 1.76 mg/g.

In summary, the chlorophyll indicators were 1.3 and 1.5- times higher in the first version, 1.7 and 2.1- times higher in the second version, 2.2 and 3- times higher in the third version and 1.2 and 2.7- times higher in the fourth version compared to the observed values (chlorophyll *a* - 1.17 mg/g, chlorophyll *b* - 0.64 mg/g).

In our study, we found that all the concentrations of salt obtained increased the amount of chlorophylls *a* and *b* compared with the control. This is thought to be due to the salt's ability to provide the sodium ions needed to facilitate photosynthesis. Furthermore, as described in some scientific studies, the increase in chlorophyll *a* and *b* pigments in the biomass of the microalgae strain *S. obliquus* sp. B7 is associated with an increased adaptability of the microalgae cultures to the sodium chloride salt in the nutrient medium and their acute metabolic necessity in their cells [18].

In subsequent studies, we observed the effect of different concentrations of NaCl on the total lipids contained in the cell of the microalgae *S. obliquus* sp. B7 strain (Figure 4).

The lipid content in the biomass at various salt concentrations and under control was as follows: 12.82% in control, 14.56% and 20.43% increase in sodium chloride at 2.5 and 5.0 g/l and 24.25% and 32.26% increase in lipid content at 10 and 15 g/l salt concentration.

A significant correlation was attended between the concentration of NaCl and the content of lipids. Thus, a high lipid content was observed at high NaCl concentrations, which may be due to the amount of salt and nitrogen deficiency in the nutrient medium. It has also been noted that high salinity increases lipid yield and that the strain *Scenedesmus* sp. increases lipid accumulation under high salinity conditions in the work of Punch et al. In addition, under damaged or restricted growth conditions (stress conditions), neutral microalgal lipids accumulate in the biomass in the form of lipid droplets and are important supporting components of the cytoplasm and cell [19].

The study showed that the lipid content of the first variant (2.5 g/l NaCl) increased by 1.1 times compared to the control (12.82 g/l NaCl), the second variant (5.0 g/l NaCl) by 1.6 times, the third variant (10 g/l NaCl) by 1.9 times and the fourth variant (15 g/l NaCl) by 2.52 times.

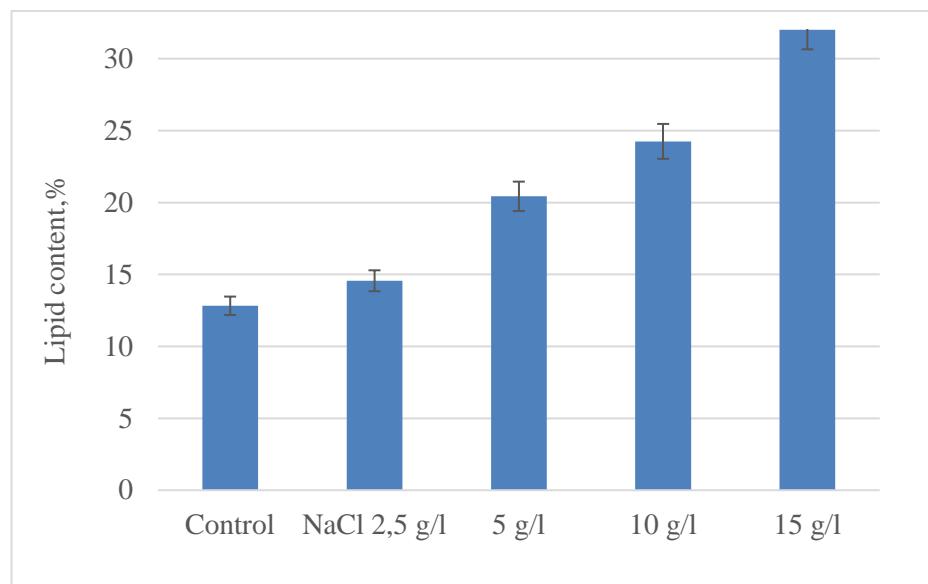


Figure 3 - Amount of lipid accumulation in the microalgae *S. obliquus* sp. B7 strain, %

High levels of total lipids were found in the biomass grown in the medium with the highest sodium chloride content (15 g/l). This indicates that lipid performance is directly proportional to the biomass of microalgae and lipid content. However, lipid content is independent of biomass composition, i.e. increases in biomass have little or no effect on lipid content [19].

Based on these experimental studies and considering the high lipid accumulation at high NaCl concentrations, it can be concluded that the *S. obliquus* sp. B7 strain has the ability to produce lipids. This could be an adaptive mechanism enabling microalgal cells to respond to higher osmolarity and maintain cell membrane fluidity and integrity at high NaCl concentrations. Therefore, the experimental study highlights the importance of the element NaCl, added to the nutrient medium, which is essential for the maintenance of microalgal viability, productivity, metabolic processes and reproduction.

Conclusion

Thus, the cell growth density of the experimental microalgae *S. obliquus* sp. B7 strain was measured in the grown medium (for 10 days) with the addition of various concentrations of sodium chlorine salt, and the results showed that: when compared to the control, the growth density of microalgae increased by 40% at a concentration of sodium chlorine 2.5 g/l; and at a concentration of sodium chlorine 5 g/l this indicator increased by 60%; at a concentration of 10 g/l, it was found that the following sodium chlorine increased by 80%, at a concentration of 15 g/l it was established that the growth density of sprouted microalgae decreased by 18%.

During the experiment it was found that the chlorophyll indicators in the first version increased by 1.3 and 1.5 times, in the second by 1.7 and 2.1 times, in the third by 2.2 and 3 times and in the fourth by 1.2 and 2.7 times compared to the observations (chlorophyll a - 1.17 mg/g, b - 0.64 mg/g).

The total lipid content of the microalgal biomass in the experiment was determined. It was found that the content of lipids in the biomass at NaCl concentrations of 2.5 and 5.0 g/l (lipids - 14.56 and 20.43%) increased by 1.1 and 1.6 times, respectively, compared to the observations (lipids - 12.82%), and this indicator increased by 1.9 and 2.52 times at NaCl concentrations of 10 and 15 g/l (lipids - 24.25 and 32.26%).

Funding

This research was funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP09260077, AP14972916).

References:

- 1 Fodorpataki L., Bartha C. Salt stress tolerance of a freshwater green alga under different photon flux densities. *Stud. U.B.B. Biol.*, 2004, 49: 85–93.
- 2 Karyakin D.O. Optimizatsiya pitatel'noj sredy dlya kul'tury *Scenedesmus* sp. [Optimization of the nutrient medium for the culture of *Scenedesmus* sp.]. D.O. Karyakin, N.V. Mal'tsevskaya, M.V. Novicheva [i dr.]. *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal*, 2017, 8(62) (doi: 10.23670/IRJ.2017.62.081).
- 3 Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslej – obitalej vodnykh ekosistem [Applied aspects of the use of microalgae – inhabitants of aquatic ecosystems]. *Ekosistemy, ikh optimizatsiya i okhrana*, 2009, 20: 120–133.
- 4 Romanenko E.A., Kosakovskaya I.V., Romanenko P.A. Phytohormones of Microalgae: Biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt I. Auxins, Abscisic Acid, Ethylene. *IJA*, 2015, 17(3): 275–289.
- 5 Dmitrovich N.P. Vliyanie fiziologicheskogo sostoyaniya mikrovodoroslej na sootnoshenie v ikh kletkakh razlichnykh pigmentov [The effect of the physiological state of microalgae on the ratio of various pigments in their cells]. N.P. Dmitrovich, T.V. Kozlova. *Vestn. Poles. gos. un-ta. Ser. prir. nauk*, 2015, 1: 40–43.
- 6 Anand V., Kashyap M., Samadhiya K., Ghosh A., Kiran B. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: a biodiesel trigger. *Biomass Bioenergy*, 2019, 127: 105252 (doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.05.021).
- 7 Gaubert J., Payri C. E., Vieira C., Solanki H., Thomas O. P. High metabolic variation for seaweeds in response to environmental changes: a case study of the brown algae *Lobophora* in coral reefs, 2019, 993(9): 1–12 (doi.org/10.1038/s41598-018-38177-z).
- 8 Lartigue J., Neill A., Hayden B.L., Pulfer J., Cebrian J. The impact of salinity fluctuations on net oxygen production and inorganic nitrogen uptake by *Ulva lactuca* (*Chlorophyceae*). *Aquat. Bot.*, 2003, 75: 339–350.
- 9 Romanenko E.A., Romanenko P.A., Babenko L.M., Kosakovskaya I.V. Salt stress effects on growth and photosynthetic pigments' content in algoculture of *Acutodesmus dimorphus* (*Chlorophyta*). *Int. J. Algae*, 2017, 19: 271–282.
- 10 S. Lomadze, R. Kabirov, E. Purina, L. Safiullina, A. Ivanova. Vozdejstvie solej natriya na mikroskopicheskuyu zelenuyu vodorosl' *Scotiellopsis rubescens* [The effect of sodium salts on the microscopic green alga *Scotiellopsis rubescens*]. *ZHurnal «Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy teorii i praktiki»*. Seriya: *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*, 2018, 7: 14–17.
- 11 Gupta B., Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*, 2014 (doi: 10.1155/2014/701596).
- 12 Lawton R.J., De Nys R., Magnusson M.E., Paul N.A. The effect of salinity on the biomass productivity, protein and lipid composition of a freshwater macroalga. *Algal Research*, 2015: 213–220 (doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.001).
- 13 Bleakley S., Hayes M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 2017, 6(5): 33 (doi.org/10.3390/foods6050033).
- 14 D.N. Pavlovna, K.A. Sergeevna, S.N. Anatol'evna Vliyanie pitatel'noj sredy i intensivnosti barbotazha na dinamiku fiziologicheskikh parametrov rosta khlorely [Influence of nutrient medium and bubbling intensity on the dynamics of physiological parameters of chlorella growth]. *Vestnik Polesskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskikh nauk*, 2016, 2: 13–18.
- 15 Zhila N.O., Kalachyova G.S., Volova T.G. Vliyanie solenosti sredy na rost i biokhimicheskij sostav zelenoj mikrovodorosli *Botryococcus braunii* KüTZ IPPAS H-252 [Influence of salinity of the medium on the growth and biochemical composition of the green microalga *Botryococcus braunii* KüTZ IPPAS H-252]. *ZHurnal SFU. Biologiya*, 2011, 4(3): 229–242.
- 16 Na Liu, Yiwen Mou, Kunyang Su, Xue Li, Tianxiang Lu, Wenbao Yan, Mingming Song, Ze Yu. The effect of salinity stress on the growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* FACHB-1297 under xylose mixotrophic cultivation. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 165: 887–894, ISSN 0957-5820 (doi.org/10.1016/j.psep.2022.07.051).
- 17 Elloumi W., Jebali A., Maalej A., Chamkha M., Sayadi S. Effect of mild salinity stress on the growth, fatty acid and carotenoid compositions, and biological activities of the thermal freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Biomolecules*, 2020, 10: 1515 (doi.org/10.3390/biom10111515).

18 Pancha I., Chokshi K., Mishra S. Enhanced biofuel production potential with nutritional stress amelioration through optimization of carbon source and light intensity in *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour Technol.*, 2015, 179: 565–572 (doi:10.1016/j.biortech. 2014.12.079).

19 Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.*, 2015, 102 (3): 3071–3076.

IRSTI: 62.13.99

S.A. NADIROVA^{1*}, Yu.A. SINYAVSKIY²,
Zh.T. LESSOVA¹, B.N. ALIBAYEVA¹, Zh.B. DARMENKULOVA¹

¹Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh Academy of Nutrition, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: sanama_777@mail.ru

THE EFFECT OF PROBIOTIC STARTER CULTURE ON THE FERMENTATION PROCESS OF YOGURT

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.10

Abstract

This article presents the results of studying the effect of starter cultures on the process of yogurt fermentation.

It is known that the microorganisms that make up the starter cultures for yogurt, depending on the physiological characteristics, form milk-protein clots with different types of consistency and with varying degrees of viscosity during the fermentation of milk. For drinking yoghurt, viscous type starters with a reduced tendency to syneresis are used. Three different starter cultures were used in the technological process, representing the object of this study: symbiotic cultures of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus fermentum 14* isolated from goat's milk. As a raw material, goat milk of the Zaanen breed of the Almaty region was used.

The interaction between the three types of bacteria is influenced by the amount of each type introduced, the temperature and the time of ripening. The strain *Lactobacillus fermentum 14*, isolated from goat milk and deposited in the Republican Collection of Microorganisms (Astana), was used as a probiotic culture to strengthen the antagonistic properties of the starter. The interaction of different types of bacteria is influenced by the amount of each introduced type, temperature and time of fermentation. It was found that the sample of yogurt with starter culture included *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophiles*, and probiotic culture *Lactobacillus fermentum 14* had the best sensory properties.

Keywords: goat milk, starter culture, symbiotic cultures, yogurt, organoleptic indicators.

Currently, the Kazakh market has a significant range of starter cultures for yogurt offered by domestic and foreign companies with recommendations for their use [1, 2].

When developing new types of yoghurts, primary attention is paid to the properties of starters that contribute to the formation of a dense structure and thick consistency of products, a reduction in the duration of fermentation and low post-oxidation. Low post-oxidation improves the taste and consistency of the product during production, packaging and transportation, especially in conditions of insufficient refrigeration or temperature changes [3].

The starter is the most important factor in determining the quality of yogurt, influencing its quality and nutritional characteristics, as well as determining the conditions of the fermentation process and the end fermentation metabolites. Usually, symbiotic cultures are used for the production of yogurt, consisting mainly of the bacteria *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Lactobacillus fermentum is a strain of gram-positive bacteria that acts as a probiotic. The use of this strain in dairy products can have an antibacterial effect on certain digestive tract microorganisms and an antioxidant effect on certain free radicals. For example, it is present in some popular cheese varieties (Conte, Ragusano). As an energy source *Lactobacillus fermentum* strain uses fermentable carbohydrates such as arabinose, galactose and others. The use of intestinal microorganisms as probiotics in the development of new foods is aimed at the prevention and treatment of various health problems: allergies, tumor growth and inflammatory bowel diseases [4, 5].

One of the promising areas is the design of new types of symbiotic starters and the development of dairy-based product technologies that include optimal consortia of probiotic microorganisms in terms of compatibility.

Many strains of lactic acid bacteria that are used in the food industry are probiotics that have a stimulating and regulating effect on the body, have antagonistic properties against pathogenic and opportunistic microorganisms of the gastrointestinal tract. These mainly include *Lactobacillus*, a genus of Gram-positive anaerobic non-spore-forming lactic acid bacteria [6, 7].

For the manufacture of sour milk products are used production, as well as direct application of starter. Their purpose is to introduce into the milk mixture, lactic acid microorganisms intended for fermentation. The advantages of direct application starters are that they contain a much larger number of lactic acid microorganisms; they are intended for direct introduction into the milk mixture, which completely eliminates the stages of intermediate fermentation; they minimize the influence of the human factor [8].

The aim of the work was to study and select the best starter for obtaining yogurt based on goat's milk.

Materials and methods of research

Raw milk from Saanen goats from a local dairy producer is used to obtain yoghurt samples. Three different starters were used in the technological process, which were the objects of this study, they are: YO MIX 495 LYO 100 DCU, YO MIX 883 LYO 50 DCU (Danisco, Germany) and our proposed starter, which is a combination of *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Danisco) and a strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus fermentum* 14, isolated from goat milk, deposited in the Republican Collection of Microorganisms (Astana).

The determination of acidity was carried out by the potentiometric method for determining titratable acidity according to GOST 31976-2012 "Yoghurts and yogurt products".

Starter MIX 495 LYO is a culture with a certain combination of strains, includes *Str. thermophilus* and *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

YOMIX 883 LYO is a highly viscous, soft-fermenting starter containing *Str. thermophilus* and *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, which gives a distinct aroma and taste; it has limited post-oxidation and light syneresis.

Lactobacillus fermentum 14 culture was used as a probiotic to improve the technological properties of the yogurt starter.

The yogurt samples were cooled and analyzed for organoleptic properties after 24 hours of storage. To determine the acidity we used a potentiometric method for determining titratable acidity according to GOST 31976-2012 "Yogurts and yogurt products".

Results and discussion

The organoleptic analysis of yogurt samples is significant for determining their qualitative assessment. Figure 1 demonstrates the influence of the duration of fermentation of starter cultures on the value of titratable acidity. All three types of starter cultures form a clot within 4-6 hours at the fermentation temperature range of $40\pm3^{\circ}\text{C}$. During this time, the titratable acidity reaches $70\text{-}75^{\circ}\text{T}$, which is optimal for clot formation.

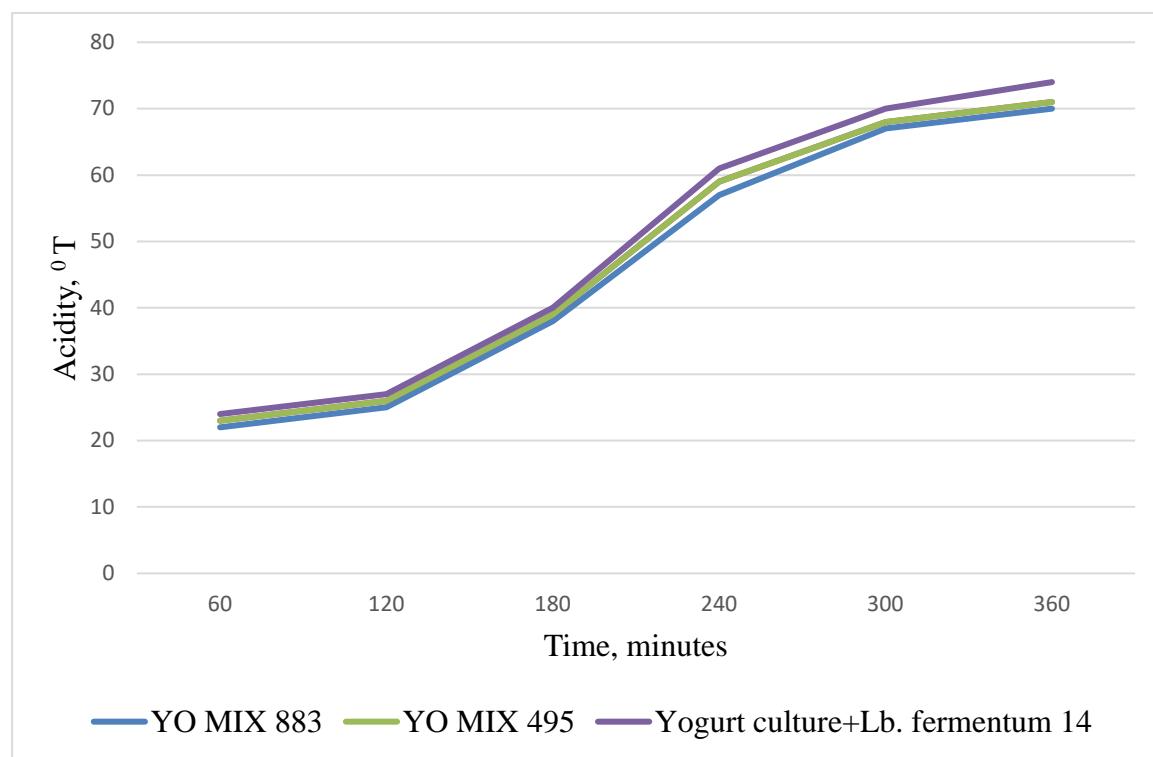


Figure 1- Influence of the duration of fermentation of starter cultures on the value of titratable acidity

As a result of the study, it was observed that when using the starter with the use of *Lb. fermentum 14*, the yogurt clot had a denser consistency with no signs of syneresis, which can be explained by the presence of exopolysaccharides in the composition of this starter. Table 1 demonstrates the dependence of the density of the clot and the presence of syneresis on the time of fermentation of starter cultures.

Table 1 - The dependence of the density of the yogurt clot and the presence of syneresis on the time of fermentation of skimmed milk

Time, min.	Types of cultures		
	YO MIX 495	YO-MIX 883	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Lb. fermentum 14</i>
60	+	+	+
120	+	+	+
180	+	+	+
240	++	+	++
300	++	++	++
360	++	++	+++

Notes: + no clot; ++ soft clot of yogurt, without separated serum; +++ dense clot of yogurt, without separated serum

Fermented yogurt samples were evaluated organoleptically on a 5-point scale according to the following indicators: appearance, creaminess; consistency, viscosity of the clot; density, uniformity; taste; color and smell. Figure 2 demonstrates the organoleptic evaluation of yogurts.

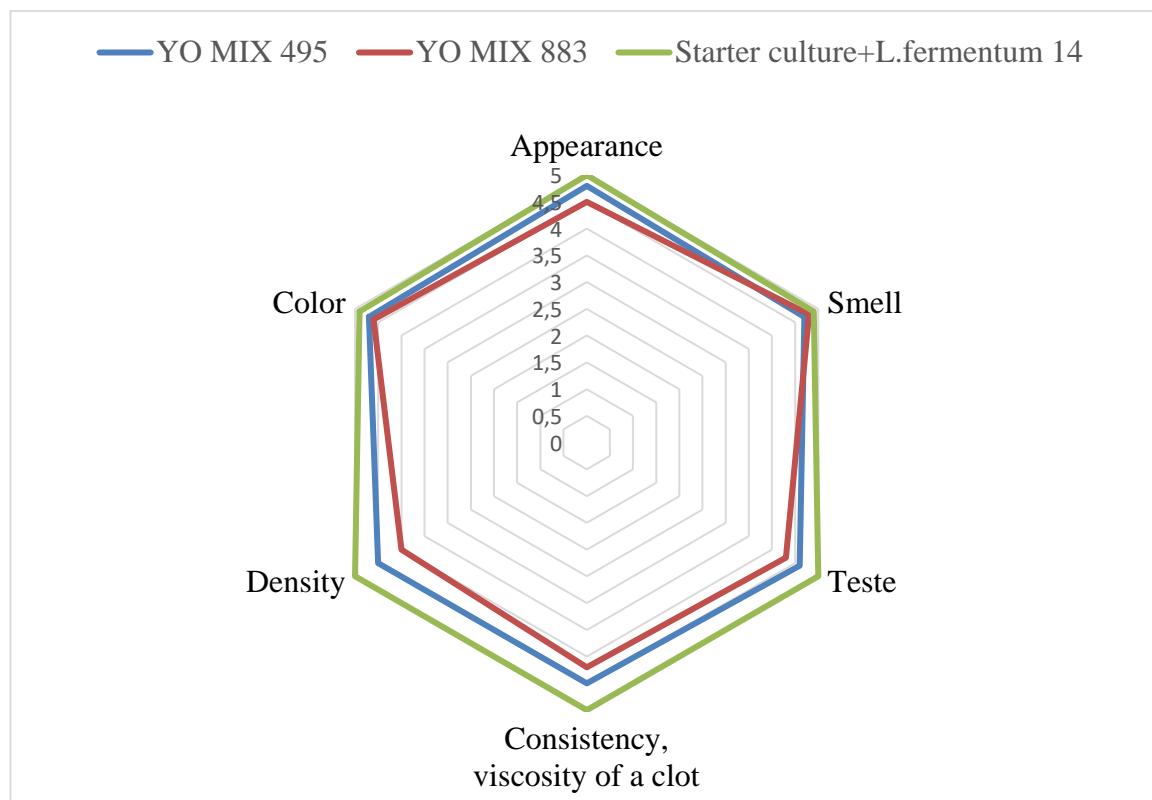


Figure 2 - Organoleptic characteristics of prototypes of yoghurts.

Figure 2 presents the organoleptic characteristics of fermented milk products based on YO MIX 495 LYO 100 DCU, YO MIX 883 LYO 50 DCU starter cultures (which contain *Str. thermophilus* and *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*) were within the normal range. The use of direct application starters, which occupy the largest share in the supply of starters to dairy plants, namely YO MIX 495 LYO 100 DCU and YO MIX 883 LYO 50 DCU (Danisco, Germany), positively affects the fermentation modes (temperature and duration of fermentation) and organoleptic characteristics of yogurts. However, a sample of yogurt with yoghurt starter *Str. thermophiles*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* and a probiotic culture of *Lb. fermentum 14*, had the best organoleptic characteristics. Organoleptic analysis of yoghurt samples really completes their qualitative assessment. According to the data of Fig. 2, the yogurt samples with the highest acceptance scores are: 19.25 for sample C followed by sample B (18.24) and sample A (15.68). As can be seen in the Fig. 2, sensory analysis demonstrates the highest level of these indicators for sample C of yogurt. High-quality yogurt cannot have good physical and chemical properties and poor organoleptic characteristics, since all product indicators must meet the required standards.

The cultures (*Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lb. fermentum 14*) produce a rapid increase in acidity to pH 4.7-4.6 and then a slower increase in acidity to a lower pH. This characteristic contributes to good pH stabilization at the end of the ripening process and during storage. The use of the culture is possible in the range 43-37 °C [3].

The dairy products fermented with YO MIX 495 starter with addition of probiotic strain *Lb. fermentum 14* reached titratable acidity 75.0 T within 6-8 hours of fermentation, thus exceeding the fermentation time by 1-1.5 hours compared to the fermented products squeezed with YO MIX 495 and YO-MIX 883 only. The results indicate that the use of *Str. thermophilus* and *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* starters based on probiotic culture *Lb. fermentum 14* in the production of yogurt helps to reduce the duration of the technological cycle of the fermented milk product and increase its antioxidant properties [9, 10].

The resulting starter exhibits good syneresis control and can also be used in sugar formulations. During the consumption of the products, there was no separation of whey.

Based on the research, it was decided to use a starter yogurt culture and probiotic culture *Lb. fermentum 14* at fermentation temperature (40 ± 3) °C in yogurt production.

Conclusion

Thus, the use of a starter culture based on commercial starter cultures of *Str. thermophilus* and *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* with the addition of a probiotic strain *Lb. fermentum 14* isolated from goat milk of the Almaty region improves the organoleptic characteristics of the final product. The yoghurt obtained from developed starter culture has a thick texture and mild taste with low post-oxidation. This starter culture and products derived from it will expand the range of dairy products produced domestically on the basis of goat's milk.

References:

- 1 Olson D.W. and K.J. Aryana. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT- Food Science And Technology*, 2008, 41: 911–918 (doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.017).
- 2 Ashraf R, Shah NP. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 149(3): 194-208 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008).
- 3 Rognlien M, Duncan SE, O'Keefe SF, Eigel WN. Consumer perception and sensory effect of oxidation in savory-flavored yogurt enriched with n-3 lipids. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(4): 1690-8 (doi: 10.3168/jds.2011-5010).
- 4 Hautefort I., Roels A., Tailliez P., Ladiré M., Raibaud P., Ducluzeau R., Fons M., Selection of *Lactobacillus fermentum* strains able to durably colonize the digestive tract of mice harboring a complex human flora, *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(1): 23–31 (doi: 10.1016/S0168-6496(98)00127-5).
- 5 Syngai GG, Gopi R, Bharali R, Dey S, Lakshmanan GM, Ahmed G. Probiotics - the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 53(2): 921-33 (doi: 10.1007/s13197-015-2011-0).
- 6 Rutella GS, Tagliazucchi D, Solieri L. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiology*, 2016 Dec; 60: 54-61(doi: 10.1016/j.fm.2016.06.017).
- 7 Simova E.D., Beshkova D.M., Angelov M.P., Dimitrov Zh.P. Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(6): 559-67 (doi: 10.1007/s10295-008-0317-x).
- 8 Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1591 (doi: 10.3390/nu11071591).
- 9 Narmaki E., Borazjani M., Ataie-Jafari A., Hariri N., Doost A.H., Qorbani M., Saidpour A. The combined effects of probiotics and restricted calorie diet on the anthropometric indices, eating behavior, and hormone levels of obese women with food addiction: A randomized clinical trial. *Nutritional Neuroscience*, 2022, 25 (5): 963-975 (doi: 10.1080/1028415X.2020.1826763).
- 10 Ma C., Chen Z., Gong G., Huang L., Li S. and Ma A. Starter culture design to overcome phage infection during yogurt fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(2): 521-527 (doi: 10.1007/s10068-015-0068-1).

С.А. НАДИРОВА^{1*}, Ю.А. СИНЯВСКИЙ², Ж.Т. ЛЕСОВА¹, Б.Н. АЛИБАЕВА¹,
Ж.Б. ДЭРМЕНҚҰЛОВА¹

¹Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

²Қазақ тағамтану академиясы, Алматы, Қазақстан

*e-mail: sanama_777@mail.ru

ПРОБИОТИКАЛЫҚ ҰЙЫТҚЫЛАРДЫҢ ЙОГУРТТЫҢ АШУ ПРОЦЕСІНЕ ӘСЕРІ

Түйін

Бұл мақалада ұйытқы дақылдарының йогурттарды ашыту процесіне әсерін зерттеу нәтижелері көлтірілген.

Йогурт стартерлерінің құрамына кіретін микроорганизмдер физиологиялық ерекшеліктеріне байланысты сүтті ашыту кезінде әр түрлі консистенциясы бар және әр түрлі тұтқырлық дәрежесі бар сүт-ақуыз тромбтарын түзетіні белгілі. Йогурт ішу үшін синерезис тенденциясы төмендеген тұтқыр типтегі ашытқылар қолданылады.

Технологиялық процесте осы зерттеудің нысанын білдіретін үш түрлі ұйытқылары қолданылды: симбиотикалық дақылдар *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* және ешкі сүтінен оқшауланған *Lactobacillus fermentum* 14. Шикізат ретінде Алматы облысының Заанен тұқымының ешкі сүті пайдаланылды.

Streptococcus thermophilus негізінен сүт қышқылын өндіруге жауапты екендігі көрсетілген, ал *Lactobacillus bulgaricus* йогуртқа ерекше дәм береді. Бактериялардың үш түрінің өзара әрекеттесуіне әрбір енгізілген түрдің мөлшері, температура және ашыту уақыты әсер етеді. Ашытқының антагонистік қасиеттерін күшейту үшін пробиотикалық дақыл ретінде ешкі сүтінен оқшауланған және Республикалық микроорганизмдер коллекциясына (Астана қ.) салынған *Lactobacillus fermentum* 14 штаммы пайдаланылады. Йогурт ашытқысы (термофильді стрептококк және болгар таяқшасы) және *Lactobacillus fermentum* 14 пробиотикалық дақылы бар йогурт ұлгісі ең жақсы органолептикалық көрсеткіштерге ие екендігі анықталды.

Кілтті сөздер: ешкі сүті, ұйытқы, симбиотикалық дақылдар, йогурт, органолептикалық көрсеткіштер.

МРНТИ: 62.00.00

С.А. НАДИРОВА^{1*}, Ю.А. СИНЯВСКИЙ², Ж.Т. ЛЕСОВА¹, Б.Н. АЛИБАЕВА¹,
Ж.Б. ДАРМЕНҚҰЛОВА¹

¹Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан

²Казахская академия питания, Алматы, Казахстан

*e-mail: sanama_777@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ЗАКВАСКИ НА ПРОЦЕСС СКВАШИВАНИЯ ЙОГУРТОВ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.10

Аннотация

В данной статье представлены результаты изучения влияния заквасочных культур микроорганизмов на процесс сквашивания йогуртов.

Известно, что микроорганизмы, входящие в состав заквасок для йогурта, в зависимости от физиологических особенностей образуют при сквашивании молока молочно-белковые сгустки с разными типами консистенции и различной степенью тягучести. Для питьевого йогурта применяют закваски вязкого типа с пониженной тенденцией к синерезису.

Объектом настоящего исследования явились три различные закваски для йогурта, в состав которых входят симбиотические культуры *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus*

thermophilus и пробиотическая культура *Lactobacillus fermentum* 14, выделенная из молока коз Зааненской породы Алматинской области. В качестве пробиотической культуры для усиления антагонистических свойств закваски использовали штамм *Lactobacillus fermentum* 14, выделенный из козьего молока и депонированный в Республиканской коллекции микроорганизмов (г. Астана). На взаимодействие различных типов бактерий влияют количество каждого внесенного типа, температура и время сквашивания. Установлено, что лучшими органолептическими показателями обладает образец йогурта с закваской, в состав которой входят *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* и пробиотическая культура *Lactobacillus fermentum* 14.

Ключевые слова: козье молоко, закваска, симбиотические культуры, йогурт, органолептические показатели.

В настоящее время на казахстанском рынке представлен значительный ассортимент заквасок для йогурта, предлагаемых отечественными и зарубежными компаниями, с рекомендациями по их использованию [1, 2].

При разработке новых видов йогуртов основное внимание уделяется свойствам заквасок, способствующим образованию плотной структуры и консистенции продуктов, сокращению продолжительности сквашивания и низкому постокислению. Известно, что низкое постокисление приводит к улучшению вкуса и консистенции продукта, что необходимо учитывать при производстве, упаковке и транспортировке, особенно в условиях недостаточного охлаждения или перепадов температур [3].

Закваска является важнейшим фактором, определяющим качество йогурта и влияющим на его качественные и питательные характеристики, а также определяющим условия процесса ферментации и конечные метаболиты ферментации. Обычно для производства йогурта используют симбиотические культуры, состоящие в основном из бактерий *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Lactobacillus fermentum представляет собой штамм грамположительных бактерий, который действует как пробиотик. Использование этого штамма в закваске для кисломолочных продуктов может оказывать антибактериальное действие на определенные микроорганизмы пищеварительного тракта и антиоксидантное действие на некоторые свободные радикалы. Например, он присутствует в некоторых популярных сортах сыра (Конте, Рагузано). В качестве источника энергии штамм *Lb. fermentum* использует ферментируемые углеводы, такие как арабиноза, галактоза и другие. Применение кишечных микроорганизмов в качестве пробиотиков при разработке новых продуктов питания направлено на профилактику и лечение различных проблем со здоровьем: аллергии, опухолевого роста и воспалительных заболеваний кишечника [7, 8].

Одним из перспективных направлений является конструирование новых видов симбиотических заквасок и разработка технологий продуктов на молочной основе, включающих оптимальные с точки зрения совместимости консорциумы пробиотических микроорганизмов.

Многие штаммы молочнокислых бактерий, используемые в пищевой промышленности, являются пробиотиками, оказывающими стимулирующее и регулирующее действие на организм, обладающими антагонистическими свойствами в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. К ним в основном относятся *Lactobacillus*, род грамположительных анаэробных неспорообразующих молочнокислых бактерий [4, 5].

Для изготовления кисломолочной продукции применяются производственные, а также закваски прямого внесения. Их назначением является внесение в молочную смесь, молочнокислых микроорганизмов предназначенных для сквашивания. Достоинствами заквасок прямого внесения является то, что они содержат гораздо большее количество молочнокислых микроорганизмов; предназначены для непосредственного внесения в молочную смесь, что полностью исключает стадии промежуточной ферментации; предельно минимизируют влияние человеческого фактора [6].

Целью работы было изучение и выбор лучшей закваски для получения йогурта на основе козьего молока.

Материалы и методы исследования

Для получения образцов йогурта использовалось сырое молоко от зааненских коз местного производителя молочной продукции. В технологическом процессе применялись три различные закваски, являющиеся объектом настоящего исследования - YO MIX 495 LYO 100 DCU, YO MIX 883 LYO 50 DCU (Danisco, Германия) и предлагаемая нами закваска, представляющая собой комбинацию *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Danisco) и штамма молочнокислых бактерий *Lb. fermentum* 14, выделенный из козьего молока, депонированный в Республиканской коллекции микроорганизмов (г. Астана). В состав закваски MIX 495 LYO входят определенные комбинации штаммов *Str. thermophilus* и *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

YO MIX 883 LYO является закваской, мягкого брожения с высокой степенью вязкости, включает *Str. thermophilus* и *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, дающие ярко выраженный аромат и вкус; имеет ограниченное постокисление и легкий синерезис.

Для улучшения технологических свойств закваски для йогурта в качестве пробиотика была использована культура *Lb. fermentum* 14.

Образцы йогурта охлаждали, а затем анализировали на органолептические свойства после 24 часов хранения. Для определения кислотности использовали потенциометрический метод определения титруемой кислотности по ГОСТ 31976–2012 «Йогурты и йогуртовые продукты».

Результаты и обсуждение

Органолептический анализ образцов йогурта важен для определения их качественной оценки. На рисунке 1 показано влияние продолжительности ферментации заквасок на величину титруемой кислотности. Все три вида заквасок образуют сгусток в течение 4-6 часов при температуре ферментации $40\pm3^{\circ}\text{C}$. За это время титруемая кислотность достигает $70\text{-}75^{\circ}\text{T}$, что является оптимальным для образования сгустка.

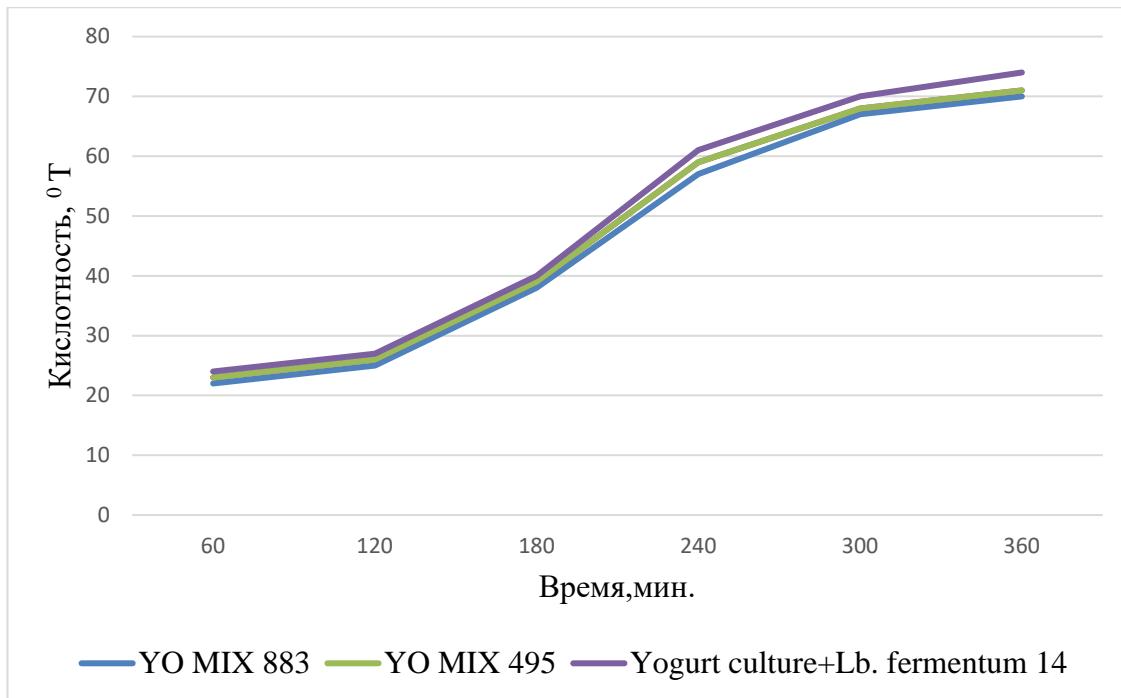


Рисунок 1- Влияние продолжительности сквашивания заквасок на значение титруемой кислотности

В результате исследований выявлено, что при использовании закваски с применением *Lb. fermentum 14* йогуртовый сгусток имел более плотную консистенцию без признаков синерезиса, что можно объяснить наличием в составе данной закваски экзополисахаридов. В таблице 1 представлена зависимость плотности сгустка и наличия синерезиса от времени ферментации заквасок.

Таблица 1 - Зависимость плотности сгустка и наличия синерезиса от времени сквашивания заквасок

Время, мин.	Типы закваски		
	YO MIX 495	YO-MIX 883	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Str. thermophiles</i> , <i>Lb. fermentum 14</i>
60	+	+	+
120	+	+	+
180	+	+	+
240	++	+	++
300	++	++	++
360	++	++	+++

Примечание: + отсутствие сгустка; ++ мягкий сгусток без отделения сыворотки; +++ плотный сгусток без отделения сыворотки

Образцы ферментированного кисломолочного продукта оценивали органолептически по 5-балльной шкале по следующим показателям: внешний вид, сливочность; консистенция, вязкость сгустка; плотность, однородность; вкус; цвет и запах. На рисунке 2 представлена органолептическая оценка йогуртов.

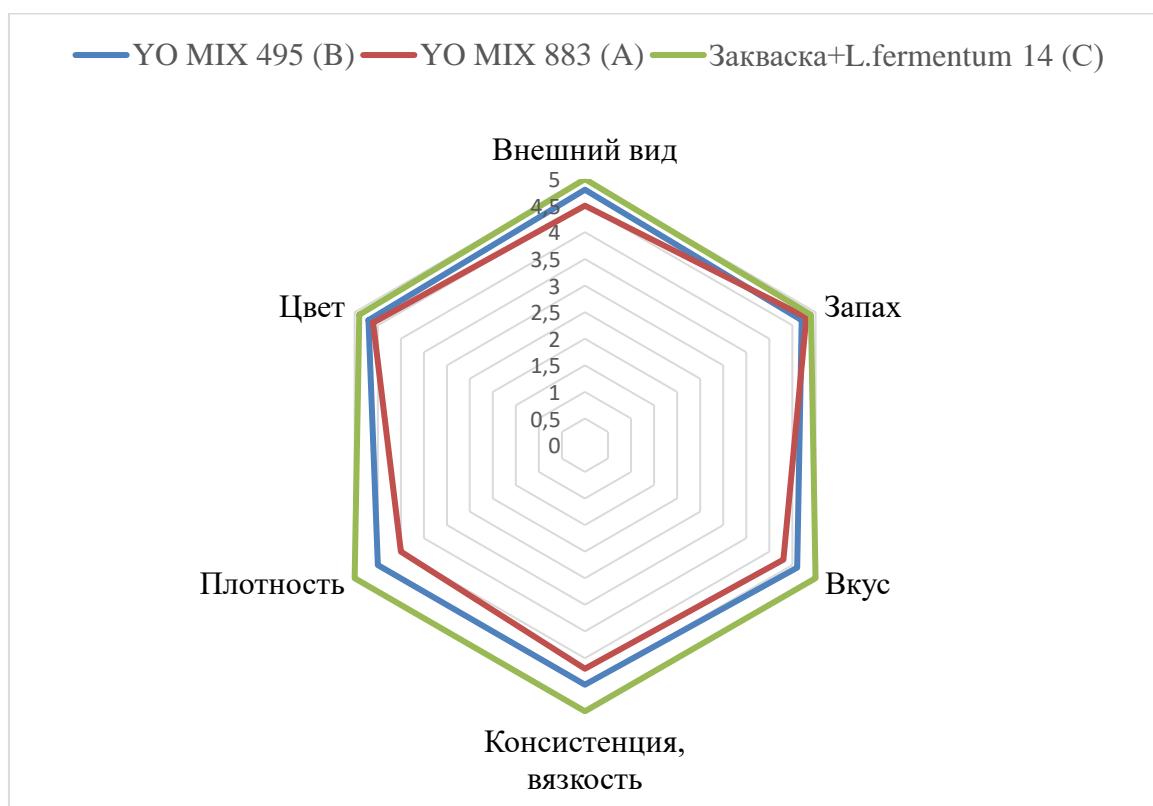


Рисунок 2 - Органолептические характеристики опытных образцов йогурта

По данным рисунка 2 органолептические показатели кисломолочных продуктов на основе заквасок YO MIX 495 LYO 100 DCU, YO MIX 883 LYO 50 DCU, а также *Str. thermophilus* и *Lb. bulgaricus* с добавлением пробиотического штамма *Lb. fermentum 14*,

были в пределах нормы. Использование заквасок прямого внесения, занимающих наибольшую долю в поставках заквасок на молочные предприятия, а именно: YO MIX 495 LYO 100 DCU и YO MIX 883 LYO 50 DCU (Danisco, Германия), положительно влияет на режимы ферментации (температуру и продолжительность сквашивания) и органолептические характеристики йогуртов. Однако лучшими органолептическими показателями обладал образец йогурта со следующей йогуртовой закваской: *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Lb. fermentum* 14. Органолептический анализ образцов йогурта фактически завершает их качественную оценку. Согласно рисунку 2, образцы йогурта с наивысшими баллами приемлемости: 19,25 для образца С, затем следуют образцы В (18,24) и А (15,68). Органолептический анализ демонстрирует самый высокий уровень этих показателей у образца С йогурта.

Качественный йогурт не может иметь хорошие физико-химические свойства и при этом плохие органолептические показатели, так как все показатели качества продукта должны соответствовать требуемым нормам.

Культуры *Str.s thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Lb. fermentum* 14 дают быстрое повышение кислотности до pH 4,7-4,6, а затем более медленное повышение кислотности до низкого pH. Эта характеристика способствует хорошей стабилизации pH в конце процесса созревания и во время хранения. Использование данной закваски возможно в диапазоне 43-37 °C [3].

Кисломолочный продукт, сквашенный закваской YO MIX 495 с добавлением пробиотического штамма *Lb. fermentum* 14, достиг титруемой кислотности 75°Т за 6-8 часов сквашивания, тем самым превысив продолжительность сквашивания на 1-1,5 часа по сравнению с кисломолочными продуктами, сквашенными только заквасками YO MIX 495 и YO-MIX 883. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование заквасок *Str. thermophilus* и *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* на основе пробиотической культуры *Lb. fermentum* 14 при производстве йогурта способствует сокращению продолжительности технологического цикла кисломолочного продукта и повышению его антиоксидантных свойств [9, 10].

Установлено, что полученная закваска демонстрирует хороший контроль синерезиса и может также использоваться в рецептурах с использованием сахара, так как при употреблении продуктов не происходит отделения сыворотки.

На основании проведенных исследований принято решение об использовании в производстве йогурта заквасочной йогуртовой культуры и пробиотической культуры *Lb. fermentum* 14 при температуре ферментации (40±3) °C.

Заключение

Использование закваски на основе товарных заквасок *Str. thermophilus* и *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* с добавлением пробиотического штамма *Lb. fermentum* 14, выделенного из молока коз Алматинской области, улучшает органолептические показатели конечного продукта йогурт, полученный из этой закваски, имеет более густую консистенцию и мягкий вкус с низким постокислением. Данная закваска и продукты, полученные на ее основе, позволят расширить ассортимент кисломолочных продуктов отечественного производства на основе козьего молока.

Литература:

1 Olson D.W. and K.J. Aryana. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT- Food Science And Technology*, 2008, 41: 911–918 (doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.017).

2 Ashraf R, Shah NP. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 149(3): 194-208 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.008).

3 Rognlien M, Duncan SE, O'Keefe SF, Eigel WN. Consumer perception and sensory effect of oxidation in savory-flavored yogurt enriched with n-3 lipids. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(4): 1690-8 (doi: 10.3168/jds.2011-5010).

4 Hautefort I., Roels A., Tailliez P., Ladiré M., Raibaud P., Ducluzeau R., Fons M., Selection of *Lactobacillus fermentum* strains able to durably colonize the digestive tract of mice harboring a complex human flora, *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(1): 23–31 (doi: 10.1016/S0168-6496(98)00127-5).

5 Syngai GG, Gopi R, Bharali R, Dey S, Lakshmanan GM, Ahmed G. Probiotics - the versatile functional food ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 53(2): 921-33 (doi: 10.1007/s13197-015-2011-0).

4 Rutella GS, Tagliazucchi D, Solieri L. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insights for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiology*, 2016 Dec; 60: 54-61(doi: 10.1016/j.fm.2016.06.017).

7 Simova E.D., Beshkova D.M., Angelov M.P., Dimitrov Zh.P. Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(6): 559-67 (doi: 10.1007/s10295-008-0317-x).

8 Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1591 (doi: 10.3390/nu11071591).

9 Narmaki E., Borazjani M., Ataie-Jafari A., Hariri N., Doost A.H., Qorbani M., Saidpour A. The combined effects of probiotics and restricted calorie diet on the anthropometric indices, eating behavior, and hormone levels of obese women with food addiction: A randomized clinical trial. *Nutritional Neuroscience*, 2022, 25 (5): 963-975 (doi: 10.1080/1028415X.2020.1826763).

10 Ma C., Chen Z., Gong G., Huang L., Li S. and Ma A. Starter culture design to overcome phage infection during yogurt fermentation. *Food Science And Biotechnology*, 2015, 24(2): 521-527 (doi: 10.1007/s10068-015-0068-1).

FTAMP: 65.63.33

К.Т. ӘДІЛОВА¹, Э.К. АСЕМБАЕВА^{1*}, К.А. МЫРЗАБЕК², А.Е. РЯБОВА³,
З.Ж. СЕЙДАХМЕТОВА¹, М. ИЛИЯСҚЫЗЫ⁴

¹Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

²Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

³Бүкілресейлік сүт өнеркәсібі ғылыми-зерттеу институты, Мәскеу, Ресей

⁴Қазақ ұлттық қыздар педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: elmiraasembaea@mail.ru

ИЗОМАЛЬТ ҚОСЫЛҒАН СИНБИОТИКАЛЫҚ СҮТҚЫШҚЫЛДЫ ӨНІМНІҢ САПАСЫН ЗЕРТТЕУ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.11

Түйін

Тамақ өнеркәсібінің басым бағыттарының бірі құрамында синбиотиктер және тәмен гликемиялық индексі бар функционалды өнімдердің технологияларын дамыту болып табылады. Синбиотиктерді қолдану ішек микрофлорасын қалыпқа келтіруге ықпал етеді, ал сахарозаны изомальтпен ауыстыру арқылы гликемиялық индекстің тәмендеуі мүмкін. Йогурт бұл мәселені шешу үшін оңтайлы өнім болып табылады. Осыған байланысты жұмыстың мақсаты изомальты қосу арқылы синбиотикалық йогурттың технологиясын жасау болды.

Мақалада изомальтпен синбиотикалық йогурт алудың технологиялық циклі берілген. Сонымен қатар физика-химиялық, органолептикалық, реологиялық және микробиологиялық зерттеулердің нәтижелері берілген. Қосымша суда еритін витаминдердің құрамы зерттелді. Алынған нәтижелерді талдау өнімнің ашытылған сүт өнімдеріне қойылатын талаптарға сай екендігін көрсетті. Суда еритін витаминдердің мөлшерінің жоғарылауы байқалды. Микробиологиялық зерттеулер нәтижесінде патогенді микрофлора табылмады, бұл оның қауіпсіздігін көрсетеді. Дегенмен, жарамдылық мерзімі сақтау шарттарымен сәйкес келеді.

Осылайша, жүргізілген зерттеулер пребиотик – изомальттың сүтқышқылды өнімдердің органолептикалық, физика-химиялық, реологиялық, микробиологиялық көрсеткіштеріне оң әсер ететінін көрсетті.

Кілтті сөздер: синбиотик, пробиотик, пребиотик, изомальт, йогурт.

Әлемнің көптеген елдерінде, соның ішінде Қазақстанда адам ағзасына емдік және профилактикалық әсер ететін функционалдық қасиеттері бар тәмен калориялы азық-түлік өнімдерін тұтынудың тұрақты өсуі байқалады. Функционалдық компоненттер тобына кіретін пробиотиктер және пребиотиктер бар синбиотикалық өнімдерді әзірлеуге қызығушылық күннен-күнге артып келеді. Осыған байланысты сүт өнімдері нарығын дамытудың перспективалық бағыты тәмен калориялы синбиотикалық өнімдердің технологияларын дамыту болып табылады.

Синбиотиктерді қолдану адамның ішек микрофлорасын қалыпқа келтірудің ең тиімді әдісі болып табылады, өйткені ол пробиотикалық микроорганизмдерді қосымша енгізуға ғана емес, сонымен қатар жергілікті микрофлораның, атап айтқанда, лакто- және бифидобактериялардың өсуін таңдамалы түрде ынталандыруға және метаболизмін белсендіруге мүмкіндік береді [1,2].

Дүние жүзінде ең көп сұранысқа ие сүтқышқылды өнім – йогурт, ол өзінің жоғары тұтынушылық қасиеттерімен, ассортиментінің әртүрлілігімен, пробиотиктер мен пребиотиктермен байытылуымен байланысты. Ишетін йогурттарды сату көлемі термостатты әдіспен алынған йогурттармен салыстырғанда жыл сайын шамамен 20%-ға артып келеді. Соңдықтан өндірісте өндірілетін өнім ассортиментінде ішетін йогурттардың болуы бәсекеге қабілеттілік пен тауар айналымын арттырады. Ишетін йогурт – өте танымал өнім. Ол пробиотикалық өнімдерге жатады. Онымен функционалды сусындардың жаңа

түрлерін жасау оңай. Йогурт ассортиментін ұлғайту жаңа байытқыштарды, тағамдық қоспаларды, сонымен қатар шикізаттың жаңа түрлерін пайдалану есебінен жүзеге асуда [3].

Тамақ өнеркәсібінде изомалт тәттілендіргіш ретінде белгілі, бірақ пребиотик ретінде де қолданылады. Изомалт (изомальтит, палатинит) – 6-O- α -D-глюкопиранозил-D-сорбитол (1,6-GPS) және 1-O- α -D-глюкопиранозил-D-маннит (1,1-GPM) қоспасы түссіз, дәмі тәтті, суда еритін кристалдар [4].

Изомалт – дәмі мен сыртқы түрі сахарозага өте үқсас жоғары сапалы, тәмен калориялы өнім. Бұл тәттілендіргіштің жеткілікті тәмен гликемиялық индексі бар – 2-9. Өнім қант диабетімен ауыратын адамдарға қолдануға рұқсат етілген, сонымен қатар ол ішек қабырғаларына өте нашар сіңеді. Ауыз қуысында изомалт қышқыл түзетін бактериялармен әрекеттеспейді, кариестің пайда болуына жол бермейді [5,6].

Изомальттың үлкен артықшылығы – ағзаны энергиямен қамтамасыз етуді реттеу мүмкіндігі. Бұл оны пайдалану кезінде қандағы қанттың күрт ауытқуын болдырмауға мүмкіндік береді. Ол сондай-ақ ішек жұмысын белсендіреді және ағзаны біркелкі энергиямен қамтамасыз ету үшін жағдай жасайды.

Изомальттың қолданудың артықшылықтарын және оны қолдану мүмкіндігінің алуан түрлілігін ескере отырып, сарапшылар алдағы жылдары сахарозадан нарықтың едөүр бөлігін қайтарып алу мүмкіндігіне ие болады деп болжайды [7].

Жұмыстың мақсаты изомалт қосылған синбиотикалық йогурт биотехнологиясын әзірлеу арқылы функционалды сүт өнімдерінің ассортиментін кеңеңтүй және оны зерттеу.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу нысаны ретінде шикі сүт; құрамы *Streptococcus salivarius subspecies thermophilus* және *Lactobacillus delbruki subspecies bulgaricus* тұратын «Lactoferm ECO» компаниясында (Италия) әзірленген өндірістік классикалық йогурт алуға арналған ұйытқы; пребиотик – құрғақ изомалт (Германия); қоспасыз йогурт (бақылау үлгісі); 10% изомалт қосылған йогурт (зерттелетін үлгі) алынды.

Зерттеу үшін стандартты әдістер қолданылды:

- органолептикалық бағалау – 5 баллдық шкала бойынша бағаланды;
- титрлеу қышқылдығы – МЕМСТ 3624-92 бойынша [8];
- белсенді қышқылдық – МЕМСТ 26781-85 бойынша [9];
- сүтқышқылды микроорганизмдердің саны – МЕМСТ 33951-2016 бойынша [10];
- ішек таяқшалары тобындағы бактериялар саны – МЕМСТ 32901-2014 бойынша [11];
- *Staphylococcus aureus* анықтау – МЕМСТ 30347-2016 бойынша [12];
- ашытқылар мен зең саңырауқұлақтары – МЕМСТ 33566-2015 бойынша анықталды [13].

Ілгіл ұстau қабілетін анықтау. Өнімнің синергетикалық қабілеті центрифугалау арқылы анықталады. Центрифуга роторының айналу жиілігі 2000 айн/мин. 10 см³ ұйындыны центрифугалық пробиркаға құяды және 30 минут бойы центрифугалайды, әрбір 5 минут сайын бөлінген сарысу көлемін дайын шыны градиурленген центрифуга пробиркасында декантациялау арқылы өлшенеді. Бөлінген сарысудың мөлшері бойынша ұйындының ылғалды ұстau қабілеті бағаланады. Нәтижелерді 10 см³ ұйындыдан алынған сарысу (см³) мөлшері көрсетеді.

Сүтқышқылды сусындардың шартты тұтқырлығы анықтау капиллярлық вискозиметрмен көмегімен өлшенеді. Бұл құрылғының жұмыс істеу принципі белгілі бір уақыт ішінде тар түтік арқылы көлемі 100 см³ сынама үлгісінің уақытын есептеуге негізделген. Сусынның сұйықтығы өз салмағымен ағып өтеді. Йогурттың шартты тұтқырлығын өлшеу секундпен өлшенеді.

Йогурт үлгілері құрамындағы суда еритін В тобындағы (B₁, B₂, B₃, B₆) витаминдер мөлшері «Капель 105» құрылғысында М-04-41-2005 әдістемесі бойынша анықталды.

Зерттеу жұмыстары Алматы технологиялық университетінің «Тағамдық биотехнология» кафедрасының және «Тамақ қауіпсіздігі» ғылыми зерттеу институтының

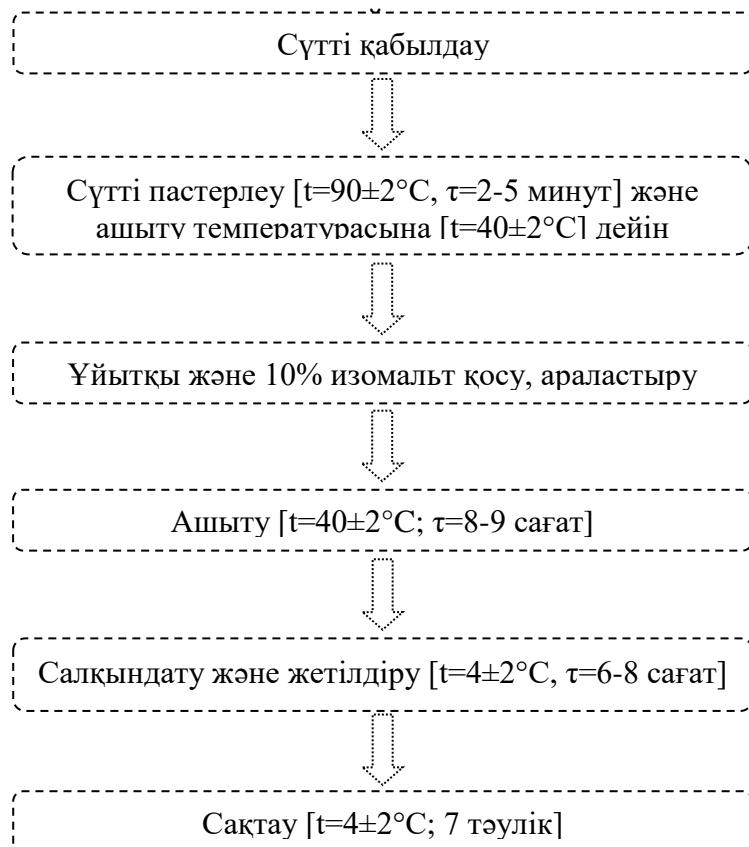
зертханаларында жүргізілді. Талдаулар 5-7 рет қайталана отырып жүргізіліп, орташа мәндері алынды.

Зерттеу нәтижелері және оны талдау

Қазіргі тағам биотехнологиясының маңызды міндеті – адамның өмірлік маңызды функцияларын сақтауды және жақсартуды қамтамасыз ететін, ағзаның агрессивті экологиялық жағдайларға жалпы төзімділігін арттыратын функционалды тамақ өнімдерін жасау.

Ашытылған сұт өнімдерін өндіру процесінде олардың консистенциясын, сыртқы түрін және сақтау тұрақтылығын айтарлықтай жақсартуға мүмкіндік беретін шикізаттар кеңінен қолданылады. Бұғаңгі таңда синбиотикалық функционалды өнімдерді жасаудың перспективалық әдісі технологиялық және физиологиялық функционалдығы бар табиғи текті заттарды іздеу және өндіріске енгізу болып табылады.

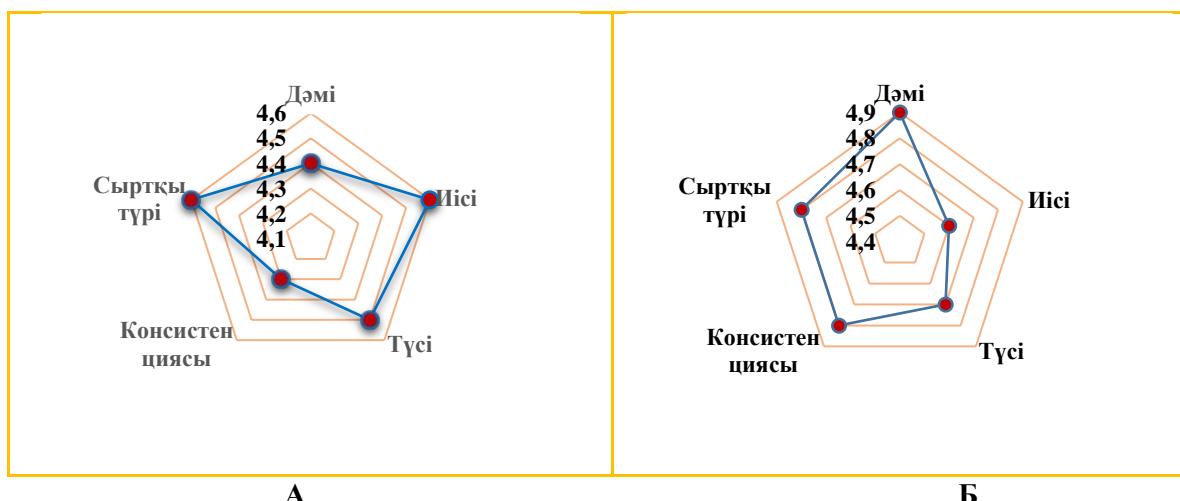
Бұл жұмыста сүтқышқылды өнім алуға қолданылатын шикізаттың, ұйытқының, изомальттың қасиеттері ескеріле йогурт алу технологиясы жасалды, ол төмендегі 1-суретте келтірілген.



Сурет 1 – Синбиотикалық йогурт алу технологиясы

Дайындалған йогурт түрлерінің сақтау мерзімін анықтау үшін сақтау кезінде негізгі органолептикалық және физика-химиялық көрсеткіштерінің өзгеру динамикасын зерттедік.

Өнімдердің органолептикалық және физика-химиялық көрсеткіштерін бағалау дайын өнімді алғаннан кейін, сондай-ақ сақтау кезінде жүргізілді. Олардың құрамы мен қасиеттері тәжірибелік сынақтармен расталады. Органолептикалық көрсеткіштерді анықтау нәтижелері 2-суретте көрсетілген.

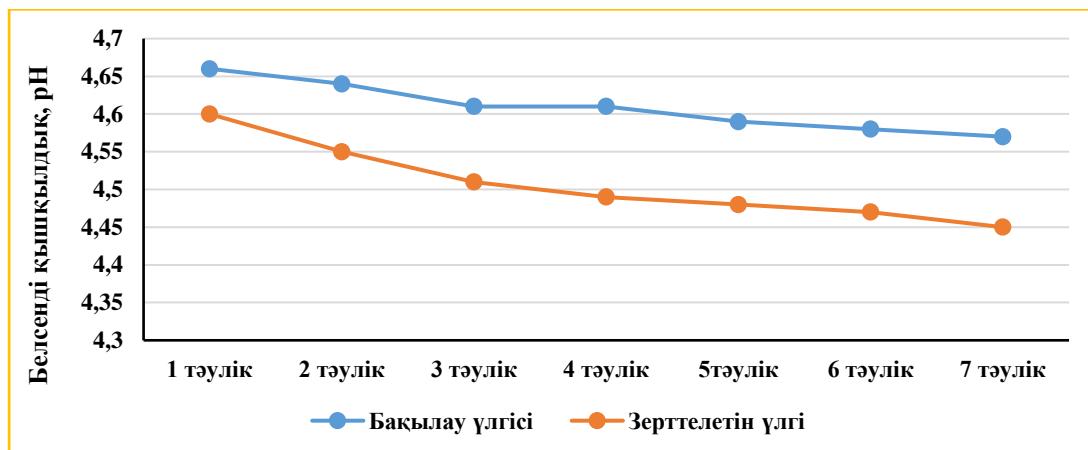


Сурет 2 – Йогурт ұлгілерінің органолептикалық сапа көрсеткіштерінің профилограммасы
А – бақылау ұлгісі; Б – зерттелетін ұлғі

Изомальт қосылған йогурт жақсы органолептикалық сипаттамаларға ие болды: тенденстірлген тәтті дәмі, таза сүтқышқылды ісі бар, консистенциясы біртекті, тығыз. Дегустация нәтижелері бойынша қоспасызы йогурт – 4,48 баллды құраса, изомальт қосылған йогурт – 4,76 баллды құрады.

Йогурт үшін консистенциясы да, сақтау кезіндегі тұрақтылығы да (құрылымның сақталуы) маңызды фактор болып табылады. Йогурт консистенциясы коагуляцияланған сүт протеинінің реологиялық көрсеткіштерімен сипатталады.

Сақтау кезеңінде йогурт өнімінің ұлгілерінде белсенді қышқылдықтың pH мәнінің айтарлықтай төмендеуі байқалды (3 сурет).

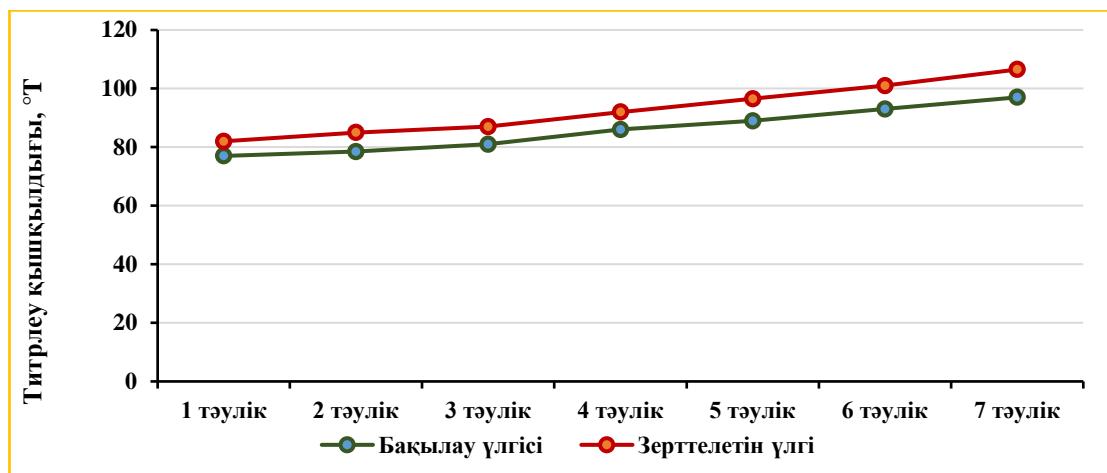


Сурет 3 – Сақтау кезінде белсенді қышқылдықтың (pH) өзгеруі

Алғашқы үш тәуліктे бірлік диапазонында pH мәндерінің айтарлықтай төмендеуі байқалды, бұл сақтау кезінде пайдаланылған ұйытқының ашытуды жалғастыруына байланысты болуы мүмкін. Белсенді қышқылдықтың жоғары мәндері дәстүрлі технологиямен өндірілген бақылау ұлгісінде – 4,57-4,66 аралығында болды. Изомальт қосылған кезде pH мәні төмендейді, ол ұйытқы дақылын дамыту үшін жақсы қоректік орта бола алады. Зерттелетін ұлғіде pH мәні 4,45-4,60 болды.

Сонымен қатар, барлық сақтау кезеңінде титрлеу қышқылдығының жоғарылауы байқалды. Ұйытқы дақылының микроорганизмдерінің даму жылдамдығы мен қышқылдық арасында пропорционалды байланыс бар, қышқылдықтың жоғарылауы ашыту

жылдамдығына пропорционалды. Сақтау кезіндегі титрлеу қышқылдығының өзгеруі тәмендегі 4-суретте көлтірілген.

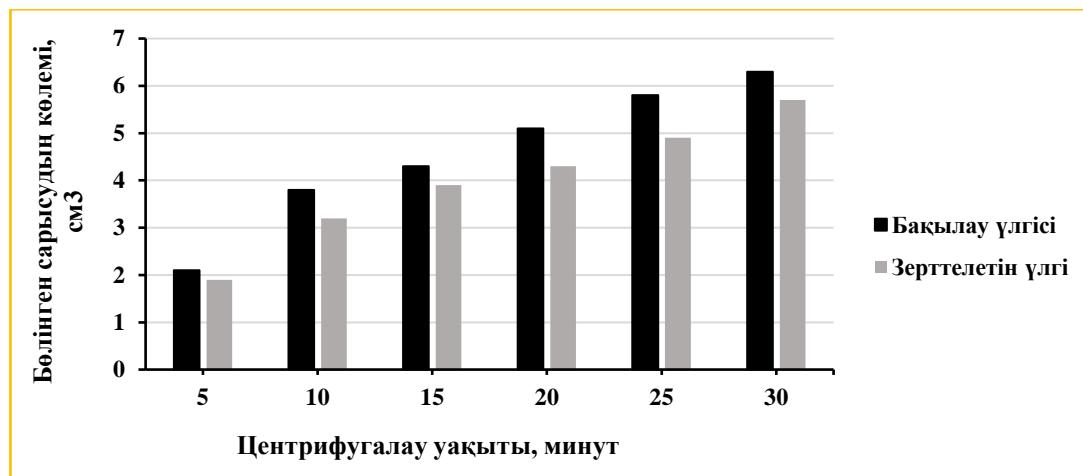


Сурет 4 – Сақтау кезіндегі титрлеу қышқылдығының өзгеруі, °T

Зерттелетін ұлгіде 7-ші тәулікте қышқылдық ($106,5 \pm 2,0$)°T жетеді, ал бақылау ұлгісінде ($97 \pm 2,0$)°T болды. Бірақ йогурт ұлгілерінің титрлеу қышқылдығы өздерінен стандарт бойынша талап етілетін мөлшерден ауытқымады.

Йогурт сапасының маңызды көрсеткіштерінің бірі оның консистенциясы болып табылады, оның қалыптасуы көптеген факторларға байланысты. Соңдықтан ашытылған сүт өнімінің дайындығын объективті бағалау үшін титрлеу және белсенді қышқылдықты өлшеумен қатар, түзілген ұйындының құрылымдық-механикалық (реологиялық) қасиеттерін ескеру қажет.

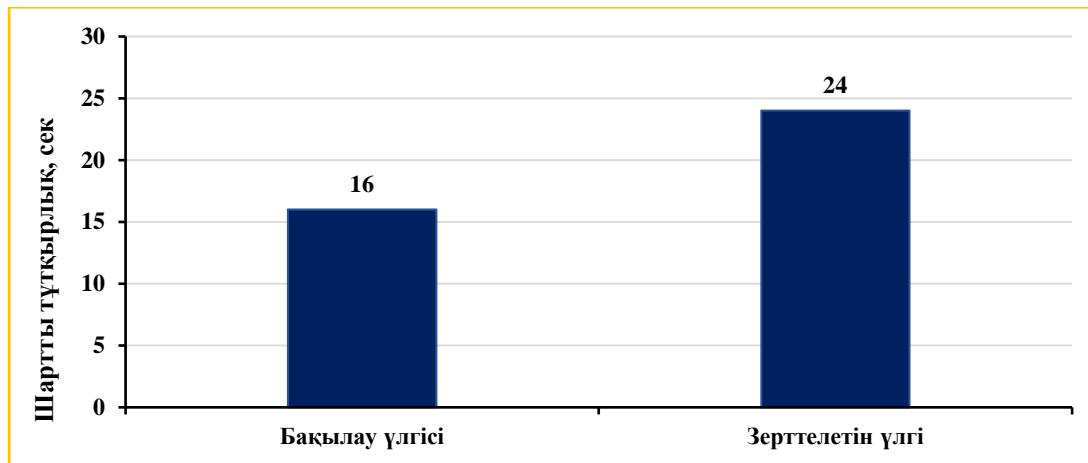
Алынған өнімнің реологиялық қасиеттерін сипаттау үшін изомальттың оның синергетикалық қабілетіне әсері зерттелді, нәтижесі тәмендегі 5-суретте көлтірілген.



Сурет 5 – Зерттелетін ұлгінің бақылау ұлгісімен салыстырғандагы ылғалды ұстай қабілеті

Изомальтты қосу ұйындының синергетикалық қабілетінің тәмендеуіне әкелді. Сонымен, 10% изомальт қосылған зерттелетін ұлгі үшін центрифугалау ұзақтығы 30 минут болғанда, бөлінген сарысу мөлшері $5,7 \text{ см}^3$, ал бақылау ұлгісінде сол уақытта $6,3 \text{ см}^3$ болды. Алынған мәліметтерге сүйенсек, ұйындының синергетикалық қабілеті изомальт қосқанда тәмендейді, бұл изомальттың ылғалды ұстай қабілетімен байланысты.

Жұмыстың барысында өнімнің реологиялық қасиеттерін сипаттайтын негізгі көрсеткіштердің бірі болып табылатын өнімдердің шартты тұтқырлығын анықтадық. Сүт өнімдерінің шартты тұтқырлығын зерттеу нәтижелері төмендегі 6-суретте келтірілген.



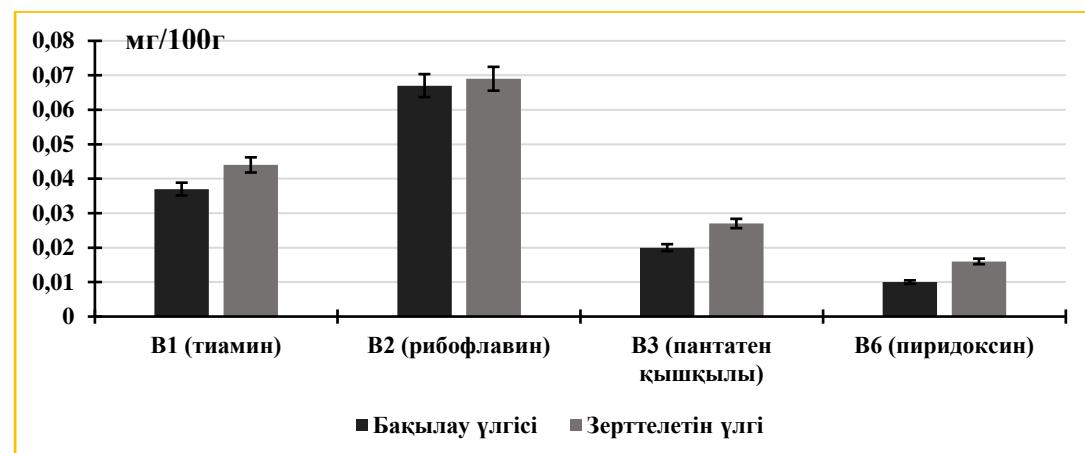
Сурет 6 – Зерттелетін үлгінің бақылау үлгісімен салыстырғандағы шартты тұтқырлығы, сек

Бақылау үлгісіне қарағанда зерттелетін үлгінің шартты тұтқырлығы 8 секундқа жоғары болды, яғни ол изомалыт қосылған йогурттың консистенциясы жоғары болатынын көрсетті.

Осы алынған талдаулар нәтижесінде йогурттарды сақтау шарттары анықталды – $4\pm2^{\circ}\text{C}$ температурада және 75%-дан аспайтын салыстырмалы ылғалдылықта 7 тәулік сақтауға болатынын көрсетті.

Витаминдер ағзаның қалыпты жұмыс істеуінде, сондай-ақ кейбір аурулардың патогенезінде маңызды рөл атқарады. Олардың көпшілігі әртүрлі метаболикалық процестердің таптырмас қатысуышылары болып табылады, олар қалыпты жасушалық зат алмасу және тіндердің трофизмі, қалыпты жұмыс істеуі және ағзаның өмірлік маңызды функцияларын сақтау үшін қажет. В тобы витаминдері суда еритін витаминдерге жатады. Олардың жоғары биологиялық белсенділігі коферменттердің – биохимиялық реакцияларды тікелей реттейтін ферменттермен кешен құрайтын төмен молекулалы белокты емес заттар ретінде ферменттік жүйелердің құрылышына қатысуға негізделген [14].

Жұмыстың барысында йогурт үлгілерінің құрамындағы В тобындағы кейбір витаминдердің мөлшерін анықтау үшін талдаулар жүргізілді, нәтижесі төменде келтірілген (7 сурет).



Сурет 7 – Йогурт үлгілерінің витаминдік құрамы, мг/100г

7-суреттегі нәтижелерден қоспасыз йогуртқа қарағанда изомалт қосылған синбиотикалық йогуртта витаминдердің мөлшерінің жоғары болатынын көруге болады. Бұл йогурт ауда қолданылатын микроорганизмдер витаминдерді өздері синтездейтінін көрсетті. Қоспасыз йогуртта $B_1 = 0,037 \pm 0,009$ мг/100г; $B_2 = 0,067 \pm 0,007$ мг/100г; $B_3 = 0,02 \pm 0,001$ мг/100г; $B_6 = 0,01 \pm 0,001$ мг/100г. болса, изомалт қосылған синбиотикалық йогуртта олардың мөлшері $B_1 = 0,044 \pm 0,007$ мг/100г; $B_2 = 0,069 \pm 0,009$ мг/100г; $B_3 = 0,027 \pm 0,002$ мг/100г; $B_6 = 0,016 \pm 0,003$ мг/100г. болды.

Сақтау кезіндегі дайын өнімнің микробиологиялық көрсеткіштеріне изомалттың әсерін зерттеуде қызығушылық тудырады, нәтижесі төмендегі 1-кестеде көлтірілген.

Кесте 1 – Йогурт үлгілерінің микробиологиялық көрсеткіштері

Үлгі	Сүтқышқылды бактериялар КТБ/см ³ (г)	МАФАнМС, КТБ/см ³ (г) көп емес	ІТТБ, 0,01 г/см ³ өнімде	<i>Staphylococcus aureus</i> 1г/см ³ өнімде	Ашытқылар, КТБ/г, көп емес	Зендер, КТБ/г көп емес
КО ТР 033/2013	1×10^7	1×10^5	Рұқсат етілмейді	Рұқсат етілмейді	50	50
Бақылау үлгісі	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	Табылмады	Табылмады	Табылмады	Табылмады
Зерттелетін үлгі	$3,2 \times 10^8$	$1,6 \times 10^3$	Табылмады	Табылмады	Табылмады	Табылмады

Кестеде көрсетілген деректер микробиологиялық зерттеулер барысында бақылау үлгісіндегі ($1,8 \times 10^7$ КТБ/см³ (г)) сүтқышқылы бактерияларының саны зерттелетін үлгімен ($3,2 \times 10^8$ КТБ/см³ (г)) салыстырғанда аз болғанын, бірақ стандартты мәндерге сәйкес келетінін көрсетеді. Мезофилді аэробты факультативті анэробты микроорганизмдер саны бақылау үлгісінде – $1,2 \times 10^4$ КТБ/см³ (г) болса, зерттелетін үлгіде – $1,6 \times 10^3$ КТБ/см³ (г) болды. Бақылау және зерттелетін йогурт үлгісінде *E. coli* тобындағы бактериялар, *Staphylococcus aureus*, ашытқы және зең санырауқулақтары табылған жоқ.

Қорытынды

Йогурт сапасын кешенді бағалау әзірленген өнімнің жақсы органолептикалық көрсеткіштерімен сипатталатынын, біркелкі консистенциялы, жағымды сергітетін дәмі бар, физика-химиялық және микробиологиялық көрсеткіштері стандартқа сәйкестігін көрсетті МЕМСТ 31981–2013 «Йогурттар. Жалпы техникалық шарттар».

Қорытындалай келе келешегі бар пребиотик изомальтпен және пробиотикалық микроорганизмдермен ашытылған йогурттың әзірленген технологиясы ассортиментті одан әрі кеңейтуге мүмкіндік береді. Сонымен қатар, зерттелетін үлгідегі сүтқышқылы бактерияларының жоғары болуына, яғни тірі пробиотикалық дақылдар мен пребиотиктердің болуына байланысты бұл йогуртты функционалды өнім ретінде жіктеуге болады.

Әдебиеттер:

1 Каменская Е.П., Обрезкова М.В., Базеева Е.Е. Особенности получения синбиотического кисломолочного продукта на основе консорциума бифидобактерий. *Ползуновский вестник*, 2018, 3: 35–40. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.03.006

2 Потороко И. Ю., Паймулина А.В., Ускова Д.Г., Калинина И.В. Научные и практические аспекты технологий продуктов питания функциональной направленности. *Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии»*, 2018, 6(1): 49–59. DOI: 10.14529/food180106

3 Щетинина Е.М., Гаврилова Н.Б., Чернопольская Н.Л. Разработка технологии обогащенного йогурта на основе козьего молока-сырья. *Ползуновский вестник*, 2020, 2: 75–77. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.014

4 Жабанос Н., Мелещеня А., Бабицкая М., Фурик Н., Головач О. Изомальт как пребиотик в кисломолочных биопродуктах "Сэнс". *Наука и инновации*, 2019, 200(10): 15–17.

5 Мацейчик И.В., Рождественская Л.Н., Ломовский И.О., Красникова А.С., Нагаева К.Е. Функциональные желированные десерты с натуральными сахарозаменителями. ТППП АПК, 2016, 5 (13): С. 82–89.

6 Асмаева З.И., Шаповалов Е.Н., Киримбаева А.А. Разработка технологии хлебобулочных изделий функционального назначения с использованием тритикалевой муки и сахарозаменителей. *Известия вузов. Пищевая технология*, 2012, 6(5): 64–66.

7 Баранов Б.А., Бондаренко Д.С., Шишкина Д.И. Натуральный сахарозаменитель изомальт, его свойства и особенности, роль в функциональном питании. *Евразийский научный журнал*, 2015, 11: 352–354.

8 ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – М.: Изд-во стандартов, 2001. – 10 с.

9 ГОСТ 26781-85 Молоко. Метод измерения pH. – М.: Стандартинформ, 2009. – 4 с.

10 ГОСТ 33951-2016 Молоко и молочная продукция Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М.: Стандартинформ, 2016. – 13 с.

11 ГОСТ 32901-2014. Молоко и продукты, переработки молока. Методы микробиологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2015. – 27 с.

12 ГОСТ 30347-2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*. – М.: Стандартинформ, 2016. – 16 с.

13 ГОСТ 33566-2015 Молоко и молочная продукция. Определение дрожжей и плесневых грибов. – М.: Стандартинформ, 2016. – 16 с.

14 Левчук Л. В., Стенникова О. В. Витамины группы в и их влияние на состояние здоровья и интеллектуальное развитие детей. *Вопросы современной педиатрии*, 2009, 8(3): 42-47.

К.Т. АДИЛОВА¹, Э.К. АСЕМБАЕВА^{1*}, К.А. МЫРЗАБЕК², А.Е. РЯБОВА³,
З.Ж. СЕЙДАХМЕТОВА¹, М. ИЛИЯСКЫЗЫ⁴

¹Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

³Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва,
Россия

⁴Казахский национальный женский педагогический университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: elmiraasembayeva@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВА СИНБИОТИЧЕСКОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ИЗОМАЛЬТОМ

Аннотация

Одним из приоритетных направлений пищевой промышленности является разработка технологий функциональных продуктов, содержащих синбиотики и пониженный гликемический индекс. Применение синбиотиков способствует нормализации кишечной микрофлоры, а снижение гликемического индекса возможно за счет замены сахарозы на изомальт. При этом оптимальным продуктом для решения данной задачи является йогурт. В связи с этим целью работы являлась разработка технологии синбиотического йогурта с добавлением изомальта.

В статье представлен технологический цикл получения синбиотического йогурта с изомальтом. Также приведены результаты физико-химических, органолептических, реологических и микробиологических исследований. Дополнительно исследовано содержание водорастворимых витаминов. Анализ полученных результатов показал, что продукт соответствовал требованиям, предъявляемым к кисломолочным продуктам. Однако было отмечено повышение содержания водорастворимых витаминов. В результате микробиологических исследований не было обнаружено патогенной микрофлоры, что свидетельствует о его безопасности. Тем не менее, допустимый срок хранения коррелирует с условиями хранения.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что пребиотик изомальт оказывает положительное влияние на органолептические, физико-химические, реологические и микробиологические показатели кисломолочного продукта.

Ключевые слова: синбиотик, пробиотик, пребиотик, изомальт, йогурт.

IRSTI: 65.63.33

K.T. ADILOVA¹, E.K. ASEMBAYEVA^{1*}, K.A. MYRZABEK², A.E. RYABOVA³,
Z.ZH. SEIDAKHMETOVA¹, M. ILIYASKYZY⁴

¹Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

³All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia

⁴Kazakh National Women's Teacher Training University Almaty, Kazakhstan

*e-mail: elmiraasembayeva@mail.ru

STUDY OF THE QUALITY OF A SYNBiotic FERMENTED MILK PRODUCT WITH ISOMALT

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.11

Abstract

One of the priority directions of the food industry is the development of technologies for functional products containing synbiotics and a low glycemic index. The use of synbiotics contributes to the normalization of intestinal microflora, and reducing the glycemic index is possible by replacing sucrose with isomalt. At the same time, yogurt is the optimal product for solving this problem. In this regard, the aim of the work was to develop a technology for synbiotic yogurt with isomalt.

The article presents the technological cycle for obtaining synbiotic yogurt with isomalt. The results of physicochemical, organoleptic, rheological and microbiological studies are also presented. Additionally, the content of water-soluble vitamins was studied. The analysis of the obtained results showed that the product met the requirements for fermented milk products. However, there has been an increase in water-soluble vitamins. As a result of microbiological studies, no pathogenic microflora detected, which indicates its safety. Nevertheless, the acceptable shelf life correlates with the storage conditions.

Thus, the results of the study showed that the isomalt prebiotic has a positive effect on the organoleptic, physicochemical, rheological and microbiological parameters of the fermented milk product.

Keywords: synbiotic, probiotic, prebiotic, isomalt, yogurt.

In many countries of the world, including Kazakhstan, there is a steady increase in the consumption of low-calorie foods with functional properties that have a therapeutic and prophylactic effect on the human body. Interest in the development of synbiotic products containing functional components: probiotics and prebiotics is growing day by day. In this regard, a promising direction for the development of the dairy products market is the development of technologies for low-calorie synbiotic products.

The use of synbiotics is the most effective method of normalizing the human intestinal microflora, as it allows not only to additionally introduce probiotic microorganisms, but also selectively stimulate the growth of local microflora, in particular lacto- and bifidobacteria, and activate their metabolism [1, 2].

The most demanded fermented milk product in the world is yogurt, which is associated with high consumer properties, a variety of assortment, enrichment with probiotics and prebiotics. Sales of drinking yogurts have been increasing by about 20% per year compared to yogurts produced in the thermostat. Therefore, the presence of drinking yogurts in the range of products produced by food making plants increases competitiveness and turnover. Drinking yogurt is a very popular product. It belongs to probiotic products and it is easy to create new types of functional drinks. The increase in the range of yogurts is due to the use of new fortifiers, food additives, as well as new types of raw materials [3].

In the food industry, isomalt is known as a sweetener, but is also used as a prebiotic. Isomalt (isomaltite, palatinite) is a mixture of 6-O- α -D-glucopyranosyl-D-sorbitol (1,6-GPS) and 1-O- α -D-glucopyranosyl-D-mannitol (1,1-GPM) colorless water-soluble crystals with a sweet taste [4].

Isomalt is a high quality, low calorie product that tastes and looks very similar to sucrose. This sweetener has a fairly low glycemic index of 2-9. The product is approved for use by people with diabetes, in addition, it is very poorly absorbed by the walls of the intestine. In the oral cavity, isomalt does not interact with acid-forming bacteria, preventing the formation of caries [5, 6].

The great advantage of isomalt is the ability to regulate the body's energy supply. This avoids sudden fluctuations of sugar in blood when it is used. It also activates the work of the intestines and creates conditions for a balanced supply energy to the body.

Considering the advantages of using isomalt and the variety of possibilities for its use, experts predict that in the coming years there will be an opportunity to occupy a significant part of the market [7].

The aim of the work is to expand the range of functional dairy products by developing the biotechnology of synbiotic yogurt with the addition of isomalt and its study.

Materials and methods

As an object of research was taken: raw milk; industrial classic yogurt starter culture developed by Lactoferm ECO (Italy), which includes *Streptococcus salivarius subspecies termophilus* and *Lactobacillus delbruki subspecies bulgaricus*; prebiotic - dry isomalt (Germany); yogurt without additives (control sample); yogurt with 10% isomalt (test sample).

Standard methods were used for the study:

- organoleptic evaluation – rated on a 5-point scale;
- titrated acidity – according to GOST 3624-92 [8];
- the active acidity – according to GOST 26781-85 [9];
- number of lactic acid microorganisms – According to GOST 33951-2016 [10];
- number of bacteria of the group of *Escherichia coli* (coliform bacteria) – according to GOST 32901-2014 [11];
- identification of *Staphylococcus aureus* – according to GOST 30347-2016 [12];
- yeasts and fungi – determined according to GOST 33566-2015 [13].

Determination of water holding capacity. The synergistic ability of the product is determined by centrifugation. Centrifuge rotor speed 2000 rpm. 10 cm³ of the clot is poured into a centrifuge tube and centrifuged for 30 minutes, every 5 minutes is measured by decantation of the allocated volume of serum in a finished glass graduated centrifuge tube. The ability of the clot to retain moisture is estimated by the amount of whey released. The results show the amount of serum (cm³) from a 10 cm³ clot.

The relative viscosity of sour-milk drinks was measured using a capillary viscometer. The principle of operation of this device is based on the calculation of the passage time of a test sample with a volume of 100 cm³ through a narrow tube for a certain period of time. The drink liquid flows under its own weight. The relative viscosity of yogurt was measured in seconds.

The content of water-soluble vitamins of group B (B₁, B₂, B₃, B₆) in yogurt samples was determined according to the method M-04-41-2005 on the Kapel 105 device.

The research was carried out at the Almaty Technological University, in the laboratories of the Department of Food Biotechnology and the Research Institute of Food Safety. The analyzes were repeated 5-7 times, average values were obtained.

Results of the study and its analysis

The most important task of modern food biotechnology is the creation of functional food products that ensure the preservation and improvement of vital human functions, increasing the overall resistance of the body to aggressive environmental conditions.

Raw materials are widely used in the production of fermented milk products, which can significantly improve their consistency, appearance and storage stability. Today, a promising method for creating synbiotic functional products is the search for and introduction into production of natural origin substances with technological and physiological functionality.

In this paper, a technology for the production of yogurt has been developed, taking into account the properties of raw materials, starter culture, isomalt, used to obtain fermented milk products, which is shown in the Figure 1 below.

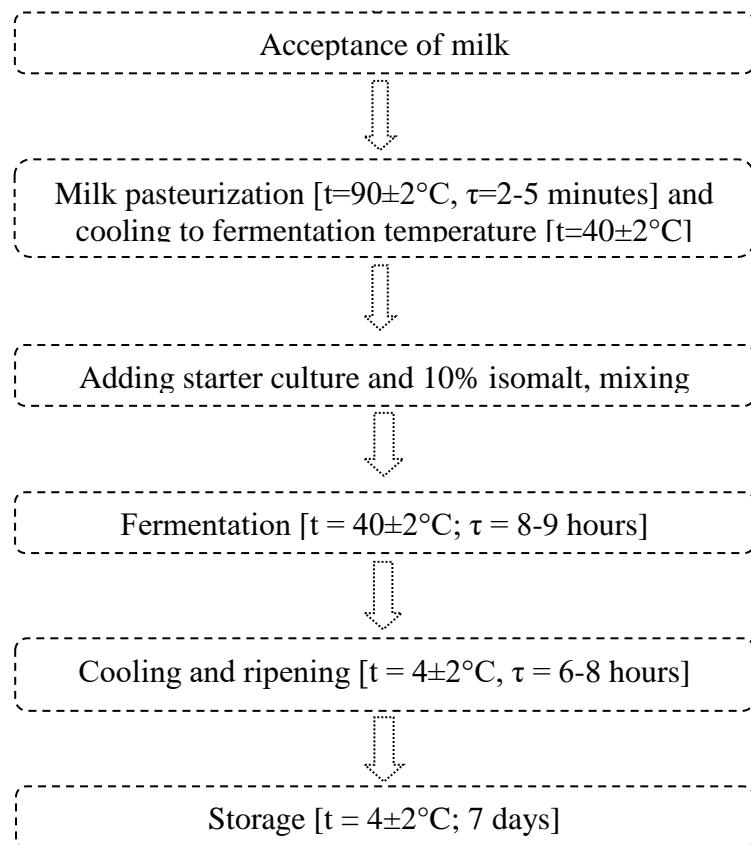


Figure 1 – Synbiotic yogurt technology

To determine the shelf life of prepared yogurt samples, we studied the dynamics of changes in the main organoleptic and physico-chemical parameters during storage.

The evaluation of organoleptic and physico-chemical parameters of products was carried out after receiving the finished product, as well as during storage. Their composition and properties are confirmed by experimental tests. The results of determining organoleptic indicators are shown in Figure 2.

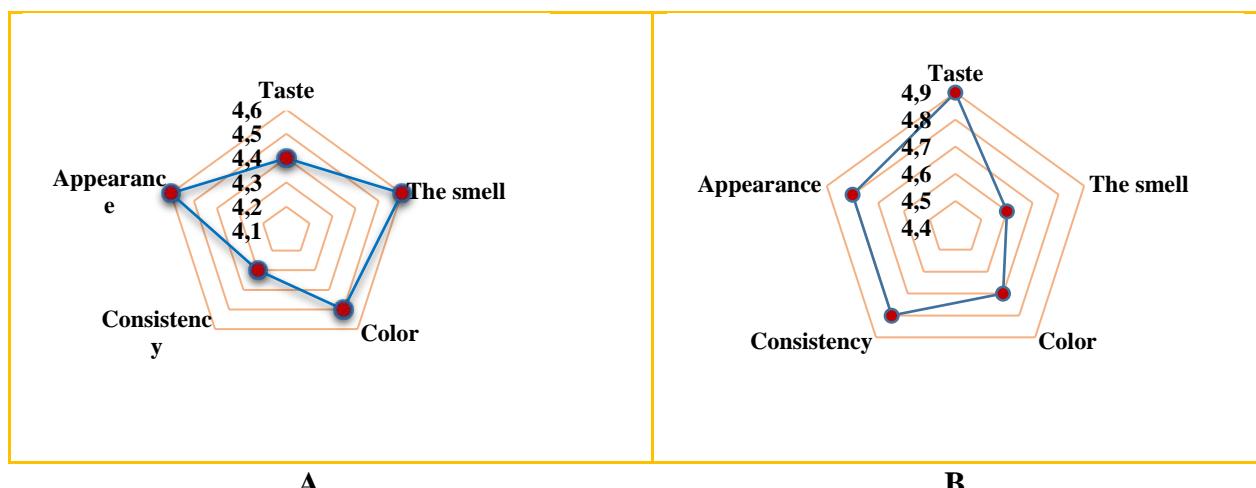


Figure 2 – Profilogram of organoleptic quality of yoghurt samples (A - control sample; B-test sample)

Yoghurt with isomalt had good organoleptic characteristics: balanced sweet taste, pure sour-milk smell, uniform and dense texture. According to the results of tasting, yogurt without additives was 4.48 points, yogurt with isomalt – 4.76 points.

For yoghurt, both consistency and storage stability (conservation of the structure) are important factors. The consistency of yogurt is characterized by the rheological parameters of coagulated milk protein.

During the storage period, a significant decrease in the active acidity pH value was observed in the samples of the yoghurt product (Figure 3).

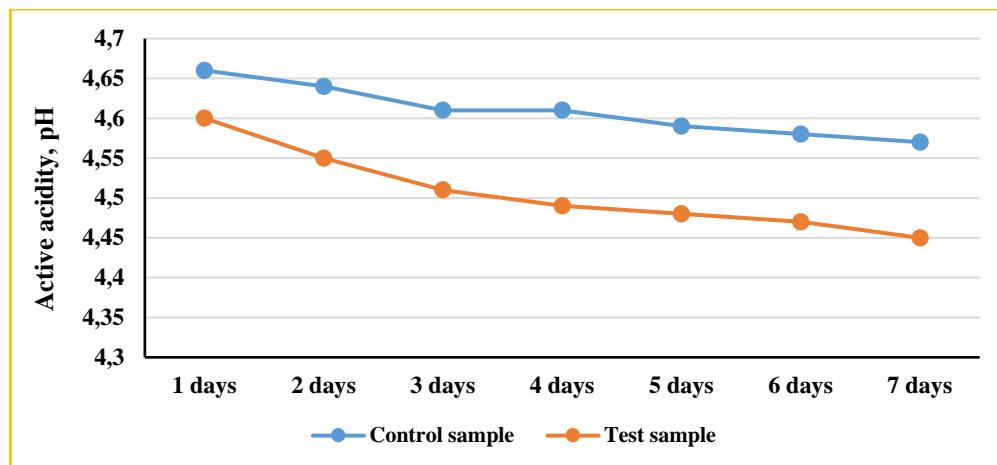


Figure 3 – Change in active acidity (pH) during storage

During the first three days, there was a significant decrease in pH values in the unit range, which may be due to the fact that the starter used during storage continued to ferment. High values of active acidity were in the range of 4.57-4.66 in the control sample produced by traditional technology. When isomalt is added, the pH value decreases, which can be a good growth medium for the development of fermentation. The test sample had a pH value of 4.45-4.60.

In addition, an increase in the acidity of the titration was observed throughout the entire storage period. There is a proportional relationship between the rate of development of starter microorganisms and acidity, the increase in acidity is proportional to the rate of fermentation. The change in acidity of the titration during storage is shown in Figure 4 below.

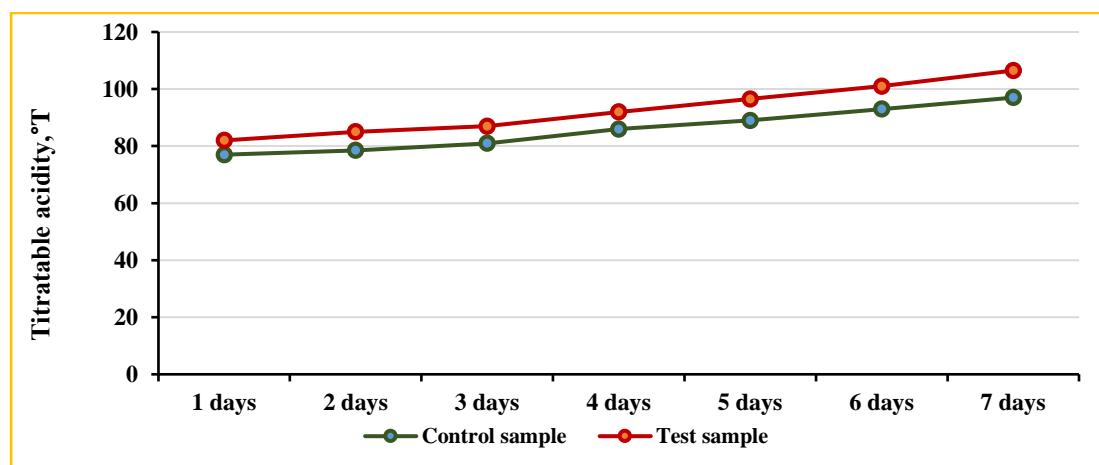


Figure 4 – Change in titration acidity during storage, °T

On the 7 th day in the test sample, the acidity reached $(106.5 \pm 2.0)^\circ\text{T}$, and in the control sample – $(97 \pm 2.0)^\circ\text{T}$. But the acidity of the titration of yogurt samples did not deviate from the norm required by the standard.

One of the most important indicators of the quality of yogurt is its consistency, the formation of which depends on many factors. Therefore, for an objective assessment of the readiness of a fermented milk product, along with titration and measurement of active acidity, it is necessary to take into account the structural-mechanical (rheological) properties of the formed clot.

To describe the rheological properties of the resulting product, the effect of isomalt on its synergistic ability was investigated, the result is presented in Figure 5 below.

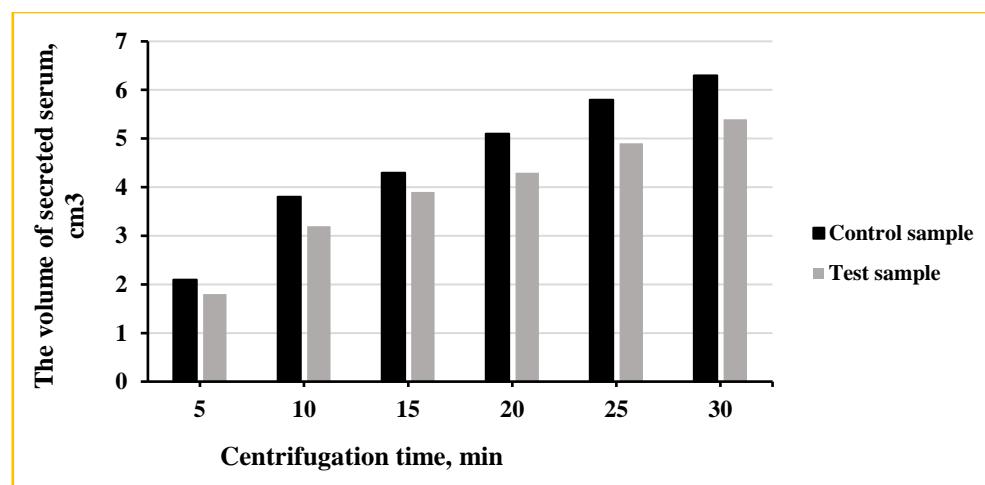


Figure 5 – The ability of the test sample to retain moisture compared to the control sample

The addition of isomalt led to a decrease in the synergistic ability of the clot. Thus, for the test sample supplemented with 10% isomalt, when the centrifugation time was 30 minutes, the amount of serum was 5.7 cm^3 and in the control sample 6.3 cm^3 at the same time. According to the data obtained, the synergistic ability of the clot decreases with the addition of isomalt, which is associated with the ability of isomalt to retain moisture.

During the course of our work, we have identified the conditional viscosity of products, which is one of the main indicators characterizing the rheological properties of products. The results of the studying the relative viscosity of dairy products are presented in Figure 6 below.

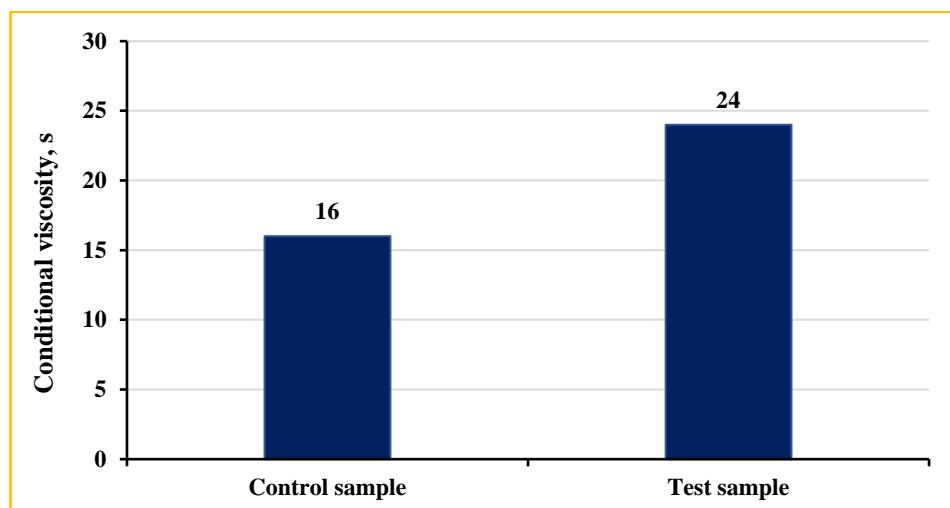


Figure 6 – Relative viscosity of the test sample compared to the control sample, sec

The relative viscosity of the test sample was 8 seconds higher than that of the control sample, which meant that the isomalt yogurt had a higher consistency.

As a result of these analyzes, the storage conditions for yogurts were determined - at a temperature of 4 ± 2 °C and a relative humidity of not more than 75%, it can be stored for 7 days.

Vitamins play an important role in the normal functioning of the body, as well as in the pathogenesis of certain diseases. Many of them are indispensable participants in various metabolic processes that are necessary for normal cell metabolism and tissue trophism, normal functioning and maintenance of vital body functions. The B vitamins are water-soluble vitamins. Their high biological activity is based on participation in the construction of coenzymes – enzyme systems as low molecular weight non-protein substances that form a complex with enzymes that directly regulate biochemical reactions [14].

In the course of the work, analyzes were carried out to determine the content of some B vitamins in yogurt samples, the results of which are shown below (Figure 7).

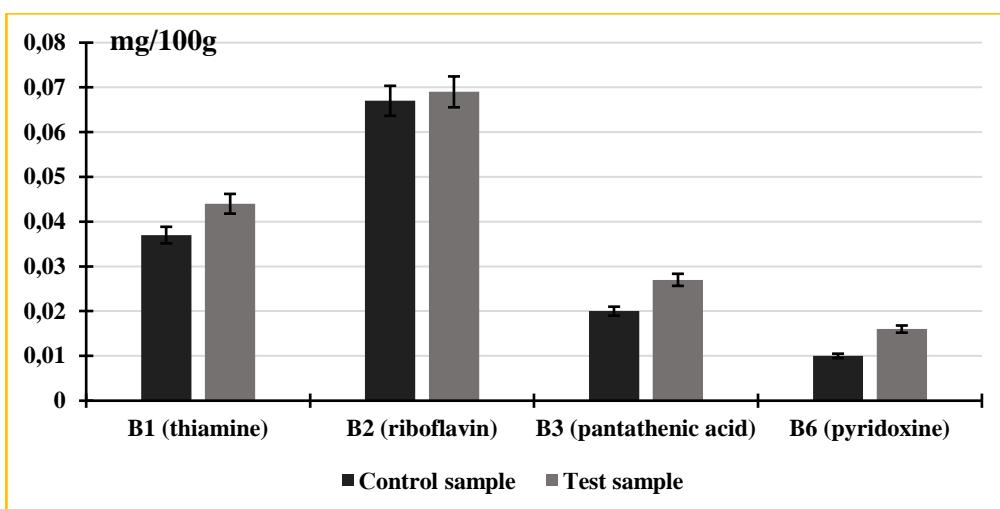


Figure 7 – Vitamin composition of yogurt samples, mg/100g

From the results in Figure 7, it can be seen that synbiotic yogurt with isomalt contains a higher vitamin content than yogurt without additives. This showed that the microorganisms used to make yogurt synthesize the vitamins themselves. In yogurt without additives B₁ – 0.037±0.009 mg/100g; B₂ – 0.067±0.007 mg/100g; B₃ – 0.02±0.001 mg/100g; B₆ – 0.01±0.001 mg/100g, in synbiotic yogurt with the addition of isomalt their amount B₁ – 0.044±0.007 mg/100g; B₂ – 0.069±0.009 mg/100g; B₃ – 0.027±0.002 mg/100g; B₆ – 0.016±0.003 mg/100g.

It is of interest to study the effect of isomalt on the microbiological parameters of the finished product during storage, the result is presented in table 1 below.

Table 1 – Microbiological indicators of yogurt samples

Sample	Lactic acid bacteria CFU/cm ³ (g)	QMAFAnM CFU/cm ³ (g). no more	Bacteria of the Escherichia coli group, 0.01 g/cm ³ in the product	<i>Staphylococcus aureus</i> 1g/cm ³ in product	Yeast, CFU/g, no more	Mold, CFU/g no more
CU TR 033/2013	1×10^7	1×10^5	not allowed	not allowed	50	50
Control sample	1.8×10^7	1.2×10^4	not detected	not detected	not detected	not detected
Test sample	3.2×10^8	1.6×10^3	not detected	not detected	not detected	not detected

The data presented in the table show that, in the course of microbiological studies, the number of lactic acid bacteria in the control sample (1.8×10^7 CFU/cm³(g)) was less compared to the test sample (3.2×10^8 CFU/cm³ (g)), but corresponded to the standard values. The number of mesophilic aerobic facultative anaerobic microorganisms in the control sample was – 1.2×10^4 CFU/cm³ (g), in the test sample – 1.6×10^3 CFU/cm³ (g). *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, yeast and fungi were not found in the control and test samples of yogurt.

Conclusion

Integrated assessment of the quality of yogurt showed that the developed products are characterized by good organoleptic characteristics, have a uniform texture, a pleasant refreshing taste, physicochemical and microbiological indicators comply with the GOST 31981-2013 standard «Yogurts. General technical conditions».

In conclusion, it should be noted that the developed technology of yogurt fermented with prebiotic isomalt and probiotic microorganisms allows to further expand the range. In addition, due to the high content of lactic acid bacteria in the test sample, i.e. the presence of live probiotic cultures and prebiotics, this yogurt can be classified as a functional product.

References:

- 1 Kamenskaja E.P., Obrezkova M.V., Bazeeva E.E. Osobennosti poluchenija sinbioticheskogo kislomolochnogo produkta na osnove konsorciuma bifidobakterij. *Polzunovskij vestnik*, 2018, 3: 35–40. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.03.006
- 2 Potoroko I. Ju., Pajmulina A.V., Uskova D.G., Kalinina I.V. Nauchnye i prakticheskie aspekty tehnologij produktov pitanija funkcion'noj napravленности. *Vestnik JuUrGU. Serija «Pishhevyje i biotehnologii»*, 2018, 6(1): 49–59. DOI: 10.14529/food180106
- 3 Shhetinina E.M., Gavrilova N.B., Chernopol'skaja N.L. Razrabotka tehnologii obogashchennogo jogurta na osnove koz'ego moloka-syr'ja. *Polzunovskij vestnik*, 2020, 2: 75–77. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2020.02.014
- 4 Zhabanos N., Meleshhenja A., Babickaja M., Furik N., Golovach O. Izomal't kak prebiotik v kislomolochnyh bioproduktah "Sjens". *Nauka i innovacii*, 2019, 200(10): 15–17.
- 5 Macejchik I.V., Rozhdestvenskaja L.N., Lomovskij I.O., Krasnikova A.S., Nagaeva K.E. Funkcional'nye zhelirovannyе deserty s natural'nymi saharozameniteljami. TPPP APK, 2016, 5 (13): S. 82–89.
- 6 Asmaeva Z.I., Shapovalov E.N., Kirimbaeva A.A. Razrabotka tehnologii hlebobulochnyh izdelij funkcion'nogo naznachenija s ispol'zovaniem tritikalevoj muki i saharozamenitelej. *Izvestija vuzov. Pishhevaja tehnologija*, 2012, 6(5): 64–66.
- 7 Baranov B.A., Bondarenko D.S., Shishkina D.I. Natural'nyj saharozamenitel' izomal't, ego svojstva i osobennosti, rol' v funkcion'nom pitanii. *Evrazijskij nauchnyj zhurnal*, 2015, 11: 352–354.
- 8 GOST 3624-92. Moloko i molochnye produkty. Titrimetricheskie metody opredelenija kislotnosti. – M.: Izd-vo standartov, 2001. – 10 s.
- 9 GOST 26781-85 Moloko. Metod izmerenija rN. – M.: Standartinform, 2009. – 4 s.
- 10 GOST 33951-2016 Moloko i molochnaja produkcija Metody opredelenija molochnokislyh mikroorganizmov. – M.: Standartinform, 2016. – 13 s.
- 11 GOST 32901-2014. Moloko i produkty, pererabotki moloka. Metody mikrobiologicheskogo analiza. – M.: Standartinform, 2015. – 27 s.
- 12 GOST 30347-2016 Moloko i molochnaja produkcija. Metody opredelenija Staphylococcus aureus. – M.: Standartinform, 2016. – 16 s.
- 13 GOST 33566-2015 Moloko i molochnaja produkcija. Opredelenie drozhzhej i plesnevyh gribov. – M.: Standartinform, 2016. – 16 s.
- 14 Levchuk L. V., Stennikova O. V. Vitaminy gruppy v i ih vlijanie na sostojanie zdrov'ja i intellektual'noe razvitie detej. *Voprosy sovremennoj pediatrii*, 2009, 8(3): 42-47.

МРНТИ: 68.41.35

В.Ю. СУЩИХ*, М.Р. ЮСУПОВ, Б. КАНАТОВ, С.М. ДЮСЕНОВ,
А.А. КАРИМОВ

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан
*e-mail: vladasali@mail.ru

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПОЧВЕННЫХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ОЧАГОВ, РАСПОЛОЖЕННЫХ В АКМОЛИНСКОЙ ОБЛАСТИ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.12

Аннотация

Почвенные очаги сибирской язвы, расположенные на территории Республики Казахстан, представляют опасность для населения и окружающей среды. Согласно ретроспективным данным, в августе 2019 года в селе Ольгинка Аршалинского района Акмолинской области была зарегистрирована вспышка сибирской язвы, при этом заболели 2 головы крупного рогатого скота. Осуществлены выезды в село Николаевка, где расположены два сибириязвенных захоронения, и в село Ольгинка, на территорию мест убоя больных животных. В процессе работы проведено эпизоотологическое обследование двух сибириязвенных очагов и мест прирезки больных животных. Для микробиологических исследований с территории данных очагов отобраны пробы почв с поверхности и с различных горизонтов на глубину до 30 см. Установлены географические координаты. Проведены лабораторные исследования отобранных образцов почв бактериологическим и биологическим методами, которые показали наличие близкородственного микроорганизма - *Bacillus cereus* и отсутствие возбудителя *Bacillus anthracis*.

Ключевые слова: почвенные очаги сибирской язвы, мониторинг, микробиологические исследования.

Территория Акмолинской области расположена в регионе с низким риском заражения возбудителем сибирской язвы, индекс эпизоотичности – 0,24.

На территории области имеется более 200 стационарно неблагополучных пунктов, эпизоотических очагов и более 70 сибириязвенных скотомогильников. Географическое расположение мест вспышек инфекции показывает антропургический характер сибириязвенной инфекции. Очаги инфекции преимущественно локализуются в густонаселенных территориях страны [1,2,3].

Особенно большую опасность в возникновении заболеваний представляют старые, заброшенные почвенные очаги сибирской язвы, где когда-то зарывали трупы животных, павших от этой инфекции [4,5]. Природные катаклизмы, такие как сильные дожди, затопления, могут привести к выносу спор возбудителя на поверхность и вспышкам заболеваний среди сельскохозяйственных животных [6,7]. Систематические бактериальные исследования почвы с территории сибириязвенных очагов является важной составляющим мониторинговых исследований в поддержании эпидемиологического и эпизоотологического благополучия.

Целью исследования являлось проведение эпизоотологического и микробиологического мониторинга на территории почвенных сибириязвенных очагов и мест прирезки больных животных, расположенных в Акмолинской области.

Материалы и методы

Для проведения эпизоотического, микробиологического мониторинга и оценки их биобезопасности были осуществлены выезды на территорию почвенных очагов, расположенных в Аршалинском районе Акмолинской области. В процессе работы обследовано два сибириязвенных захоронения, расположенных в селе Николаевка

Михайловского сельского округа, а также территория пастбища села Ольгинка, где в 2019 году отмечена гибель и прирезка больных сибирской язвой животных.

Для микробиологического мониторинга комиссиино с территорий обоих очагов и мест гибели животных отбирали пробы почвы. Предварительно проводили расчистку намеченных точек отбора от травы, камней и снимали верхний слой почвы на глубину 2,0-3,0 см. Пробы отбирали из 4 - 5 точек по периметру у краев бетонных саркофагов с поверхности и с глубины: 5 см, 10 см, 20 см и 30 см, помещали на подготовленную полиэтиленовую пленку, помещали в индивидуальные пластиковые контейнеры и маркировали. С территорий санитарно защитных зон, прилегающих к данным очагам, на расстояниях: 2 м, 5 м, 10 м, 20 м, 50 м и 100 м также были отобраны образцы почвы аналогичным методом. Всего для исследований получено 212 образцов почвы. Отбор проб почвы с территории сибиреязвенных очагов, санитарно защитных зон и мест прирезки проводили в защитном костюме 1-го типа, согласно разработанным и утвержденным требованиям [8,9].

Упакованные и промаркированные пластиковые контейнеры с пробами помещали в термошемоданы и с сопроводительными документами доставляли в институт.

В условиях лаборатории бактериологии в «заразном боксе» проводили пробоподготовку доставленных образцов с предварительной их экстракцией в стерильном физиологическом растворе и приготовлением гретых и не гретых проб.

Исследования доставленных проб на наличие возбудителя сибирской язвы проводили бактериологическим методом. Идентификацию выделенных изолятов проводили по идентификационным тестам: морфология микробы в мазках, окрашенных по Граму, Гинс-Бурри; рост микробы на бульоне Хоттингера; рост на агаре Хоттингера; проба с сибиреязвенным бактериофагом; тест на гемолитическую активность; тест на лецитиназную активность; чувствительность к пенициллину и патогенность для лабораторных животных [10,11].

Результаты и обсуждение

Согласно данным «Кадастра стационарно неблагополучных по сибирской язве населенных пунктов (СНП) Республики Казахстан 1948–2002 гг.» (Астана, 2002 г.), в Аршалынском районе зарегистрировано 13 СНП, из которых два очага расположены в с. Николаевка Михайловского сельского округа.

В процессе выезда установлено, что в селе Николаевка расположены два почвенных сибиреязвенных очага. Проведенный осмотр показал, что оба очага оборудованы аналогично, а именно: по периметру имеют плотное бетонное ограждение, внутри участки ограничены металлическими прутьями, а в центре установлены металлические столбы с надписью «Сибирская язва». Для исследований с территории данных сибиреязвенных скотомогильников отобраны образца почвы (рисунок 1).



Рисунок 1 – Процесс отбора проб почвы с территории почвенного очага

Визуальный осмотр обоих очагов показал, что на удалении 3-4 м от первого очага, расположена нора животного. С данной территории также отобраны образцы почвы (рисунок 2).



Рисунок 2- Процесс отбора проб почвы с территории норы животного, расположенной вблизи очага

Согласно ретроспективным данным, в августе 2019 года в селе Ольгинка была зарегистрирована вспышка сибирской язвы, при этом заболело 5 человек и 2 головы крупного рогатого скота. В село Ольгинка осуществлен выезд и проведены визуальные осмотры мест убоя больных животных.

Первый участок, где был произведен убой быка под инвентарным номером № KZ C 1 59139012, расположен на пастбище, находящемся на расстоянии 1000-1100 метров западнее села Ольгинка.

В 2019 году во время карантинных мероприятий на обоих участках местными ветеринарными специалистами проведены пахотные работы по периметрам в радиусе 25-30 от центра убоя животных. На первом участке (убой быка И nv. № KZ C 1 59139012) произведено снятие верхнего слоя почвы с места убоя размером 3x4 м с целью дальнейшего сжигания в инсинераторной установке.

В настоящее время осмотр показал, что на пастбище, где был проведен убой быка, четко виден ограниченный участок, с резко отличающейся растительностью, размером 2,5 x 4,0 м (рисунок 3).



Рисунок 3 – Участок убоя больного быка, снимок 2022 года

С территории данного участка проведен отбор проб почвы с поверхности и на глубину до 40 см, из 5 точек, т.е. конвертным методом (рисунок 4).



Рисунок 4 – Процесс отбора проб почвы с территории убоя больного сибирской язвой быка

Второе животное, корова (Инв.№ KZ С 1 09015090), было прирезано также на пастбище на удалении 2000 м от села.

Осмотр данной территории показал, что установить точное его местоположение весьма затруднительно, т.к. данный участок расположен на поле злаковых культур и в настоящее время вспахан.

В процессе эпизоотологического обследования было проведено определение географических координат данных участков.

Следует отметить, что визуальный осмотр территории пастбища показал наличие большого количества нор грызунов. Их порядок расположения и количество указывает на наличие многочисленных колоний слепушонка (семейство хомяковых) и пищухи (отряд зайцеобразных).

Для микробиологического мониторинга территория пастбища с наибольшим количеством нор была условно разделена на несколько участков, с каждого из которых были отобраны образцы проб почвы (рисунок 5).



Рисунок 5 – Отбор проб почвы из нор животных, расположенных на пастбище села Ольгинка

Всего в процессе командировочного выезда с территории 2-х почвенных сибиреязвенных очагов, прилегающих к ним санитарно защитных зон и мест убоя животных, было отобрано 212 проб почвы.

После завершения экспериментов все места отбора проб были обработаны горячим раствором 10% -ной каустической соды.

В результате проведенных бактериологических исследований выделено 67 изолятов, имеющих сходную морфологию с возбудителем сибирской язвы. Дальнейшее лабораторное исследование показало, что в бульоне Хоттингера выделенные культуры образовывали муть, некоторые из них росли с наличием осадка, на плотной среде отмечался рост плоских серо-белых матовых колоний с бахромчатыми краями. Все культуры обладали положительной лецитиназной и гемолитической активностью. У изолятов отсутствовала капсула *in vitro* и *in vivo*, была положительная пробы с пенициллином. Пробы с бактериофагом показали отрицательные результаты.

Биопробы на белых мышах показали, что 19 культур из 67 являлись для них непатогенными. В мазках-отпечатках и высевах из органов павших и забитых животных возбудитель *B. anthracis* не выделен. Исследования эмульсий из органов белых мышей в РНГА также дали отрицательные результаты.

Результаты тестов свидетельствуют о том, что в пробах отсутствует возбудитель сибирской язвы. При этом, установленные свойства выделенных изолятов свидетельствуют о том, что в пробах присутствуют близкородственные микроорганизмы - *Bacillus cereus*.

Заключение

На основании проведенных исследований можно заключить, что данные почвенные очаги, на пастище представляет определенную биологическую опасность для населения и окружающей среды. Наличие многочисленных нор грызунов на территории убоя животных представляет высокий риск выноса возбудителя инфекции на поверхность. Микробиологический мониторинг почв, отобранных непосредственно с территорий данных очагов, прилегающих к ним санитарно защитных зон и мест прирезки больных животных показал отсутствие возбудителя *B. anthracis*.

Учитывая биологическую опасность почвенных сибиреязвенных очагов и высокую степень риска, специалистами санитарно-эпидемиологической и ветеринарной служб рекомендовано ежегодно осуществлять микробиологический мониторинг почвы данных территорий.

Финансирование

Работа выполнена в рамках ПЦФ МСХ РК (2021-2023 гг.) по проекту «Изучить эпизоотологическую характеристику территории страны по сибирской язве и разработать ветеринарно-санитарные мероприятия по повышению их эффективности».

Литература:

- 1 Бурделов Л.А. *Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан*. Алматы, 2012: 151-171.
- 2 *Кадастровые почвенные очаги сибирской язвы на территории Республики Казахстан*. Алматы, 2017.
- 3 *Кадастровые стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Республики Казахстан 1948-2002 гг.* Астана, 2002.
- 4 Лухнова Л.Ю., Пазылов Е.К., Мека-Меченко Т.В., Избанова У.А. и др. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в 2014 году в Казахстане. *Окружающая среда и здоровье человека*, 2014, 4: 13-26.
- 5 Бадмажапова Р. Н. *Микробиологический мониторинг почв скотомогильников Республики Бурятия*. Автореф. канд. дис. СПб, 2008.
- 6 Лухнова Л.Ю., Избанова У.А., Мекамченко Т.В., Некрасова Л. Е., Атшабар Б. Б., Казаков В.С. Сибирская язва в 2016 году в Казахстане. *Медицина*, 2017, 5 (179): 56-61.

7 Manchee, R.J., Broster, M.G., Melling, J., Henstridge, R.M. & Stagg A.J. *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Natur.*, 1981, 294: 254-255.

8 Атшабар Б.Б., Лухнова Л.Ю., Мека-Меченко Т.В., Избанова У. А., Сущих В. Ю., Султанов А. К., Горелов Ю. М., Абуталип А. А., Жолшоринов А. Ж., Жумадилова З. Б., Кобжасаров Д.С. *Методические рекомендации Организация санитарно-противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий при сибирской язве в Республике Казахстан*. Алматы, 2015.

9 Султанов А.А., Горелов Ю.М., Сущих В.Ю. и др. *Почвенные очаги сибирской язвы. Порядок организации и проведения мероприятий по подготовке проб к исследованию*. Алматы, 2015.

10 Лухнова Л.Ю., Избанова У.А., Сущих В.Ю., Турегельдиева Д.А., Абиева А.А., Кунжан Н.У. *Лабораторная диагностика сибирской язвы при исследовании материала от людей и животных, из объектов внешней среды. Методические рекомендации*. Алматы, 2020.

11 Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 12.11. 2021 г. № ҚР ДСМ-114. Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 15 ноября 2021 года № 25151. Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических, санитарно-профилактических мероприятий по предупреждению особо опасных инфекционных заболеваний".

В.Ю. СУЩИХ*, М.Р. ЮСУПОВ, Б. КАНАТОВ, С.М. ДЮСЕНОВ, А.А. КАРИМОВ

Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринария институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: vladasali@mail.ru

АҚМОЛА ОБЛЫСЫНДА ОРНАЛАСҚАН СІБІР ЖАРАСЫНЫҢ ТОПЫРАҚ ОШАҚТАРЫНА ЭПИЗООТОЛОГИЯЛЫҚ ЖӘНЕ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГ ЖҮРГІЗУ

Түйін

Республика аумағында орналасқан сібір жарасының топырақ ошақтары халық пен қоршаған ортаға белгілі бір қауіп төндіреді. Ретроспективті мәліметтерге сәйкес, 2019 жылдың тамызында Ақмола облысы Аршалы ауданы Ольгинка ауылында сібір жарасының туындауы (өршуі) тіркелген, бұл ретте 2 бас ірі қара мал ауырған. Сібір жарасының екі топырақ ошақтары орналасқан Николаевка ауылына және ауру жануарлардың сойылған жерлері белгіленген Ольгинка ауылына бару жүзеге асырылды. Жұмыс барысында екі сібір жарасы ошақтарына және ауру жануарлардың сойылған орындарына эпизоотологиялық ахуал және мән-жайды анықтау мақсатында тексеру жүргізілді. Микробиологиялық зерттеулер үшін осы ошақтардың аумағынан жер бетінің үстінгі жағынан және әртүрлі горизонттардан 30 см терендейдікке дейін топырақ сынамалары алынды. Географиялық координаттыры анықталып, көрсетілді. Ирітеліп алынған топырақ үлгілерінің сынамаларына бактериологиялық және биологиялық әдістермен зертханалық зерттеулер жүргізілді. Зерттеу нәтижелері *B. anthracis* қоздырғышының жоқ екендігін, бірақ оның жақын туыстас тұқымдасы *Bacillus cereus* микроорганизмінің бар екендігін көрсетті.

Кілтті сөздер: сібір жарасының топырақ ошақтары, мониторинг, микробиологиялық зерттеулер.

IRSTI: 68.41.35

V.Yu. SUCHSHIKH*, M.R. YUSUPOV, B. KANATOV, S.M. DYUSENOV, A.A. KARIMOV
Kazakh Research Veterinary Institute, Almaty, Kazakhstan
*e-mail: vladasali@mail.ru

EPIZOOTOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL MONITORING OF SOIL ANTHRAX FOCUSES LOCATED IN AKMOLA REGION

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.12

Abstract

Soil foci of anthrax located on the territory of the republic represent a certain danger to the population and the environment. According to retrospective data, in August 2019, an outbreak of anthrax was registered in the village of Olginka, Arshalinsky district, Akmola region, and 2 heads of cattle fell ill. Visits were made to the village of Nikolaevka, where two anthrax burials are located, and to the village of Olginka, to the territory of the places where sick animals are slaughtered. In the process of work, an epizootological examination of two anthrax foci, and places where sick animals were cut, was carried out. For microbiological studies, soil samples were taken from the territory of these foci from the surface and from various horizons to a depth of up to 30 cm. Geographical coordinates were established. Laboratory studies of soil samples by bacteriological and biological methods of selected soil samples were carried out, which showed the presence of a closely related microorganism - *Bacillus cereus* and the absence of the pathogen *B. anthracis*.

Keywords: soil anthrax foci, monitoring, microbiological studies.

The territory of the Akmola region is located in a region with a low risk of infection with anthrax, the epizootic index is 0.24.

On the territory of the region there are more than 200 permanently disadvantaged points, epizootic foci and more than 70 anthrax cattle burial grounds. The geographical location of the outbreak sites shows the anthropuritic nature of the anthrax infection. The foci of infection are mainly localized in densely populated areas of the country [1,2,3].

A particularly great danger in the occurrence of diseases is the old, abandoned soil foci of anthrax, where the corpses of animals that died from this infection were once buried [4,5]. Natural disasters, such as heavy rains, flooding, can lead to the removal of pathogen spores to the surface and outbreaks of diseases among farm animals [6,7]. Systematic bacterial studies of soil from the territory of anthrax foci is an important component of monitoring studies in maintaining epidemiological and epizootological well-being.

The aim of the study was to conduct epizootological and microbiological monitoring on the territory of soil anthrax foci and places where sick animals were killed, located in the Akmola region.

Materials and methods

To conduct epizootic, microbiological monitoring and assess their biosafety, trips were made to the territory of soil foci located in the Arshalinsky district of the Akmola region. In the process of work, two anthrax burials were examined, located in the village of Nikolaevka of the Mikhailovsky rural district, as well as the territory of the pasture of the village of Olginka, where in 2019 the death and cutting of animals with anthrax was noted.

For microbiological monitoring, soil samples were taken on commission from the territories of both outbreaks and the places of death of animals. Preliminarily, the designated sampling points were cleared of grass and stones and the top layer of soil was removed to a depth of 2.0–3.0 cm. Samples were taken from 4–5 points along the perimeter at the edges of concrete sarcophagi from the surface and from a depth of 5 cm, 10 cm, 20 cm and 30 cm, were placed on prepared polyethylene film and then placed in individual plastic containers and labeled. From the territories

of sanitary protection zones adjacent to these outbreaks, at distances of 2 m, 5 m, 10 m, 20 m, 50 m and 100 m, soil samples were also taken by a similar method. A total of 212 soil samples were obtained for research. Soil sampling from the territory of anthrax foci, sanitary protection zones and cutting sites was carried out in a protective suit of the 1st type, according to the developed and approved requirements [8,9].

Packed, labeled plastic containers with samples were placed in thermal suitcases and delivered to the institute with accompanying documents.

In the conditions of the laboratory of bacteriology in the "infection box", the sample preparation of the delivered samples was preliminarily carried out, with their preliminary extraction in a sterile saline solution and the preparation of heated and unheated samples.

Investigations of the delivered samples for the presence of the anthrax agent were carried out using the bacteriological method. Identification of isolated isolates was carried out by identification tests: microbial morphology in smears stained by Gram, Gins-Burri; microbial growth on Hottinger broth; growth on Hottinger agar; test with anthrax bacteriophage; hemolytic activity test; test for lecithinase activity; sensitivity to penicillin and pathogenicity for laboratory animals [10,11].

Results and discussion

According to the "Cadastre of stationary anthrax-prone settlements (SNP) of the Republic of Kazakhstan 1948-2002" - Astana, 2002, 13 SNPs were registered in the Arshaly district, of which two centers are located in the village. Nikolaevka, Mikhailovsky rural district.

During the visit, it was established that in the village of Nikolaevka there are two soil anthrax foci. The inspection showed that both centers are equipped similarly, namely: they have a dense concrete fence around the perimeter, inside the areas are limited by metal bars, and metal poles with the inscription "Anthrax" are installed in the center. For research, soil samples were taken from the territory of these anthrax cattle burial grounds (Figure 1).



Figure 1 - The process of sampling soil from the territory of the soil focus

A visual inspection of both foci showed that at a distance of 3-4 m from the first foci, there is an animal burrow. Soil samples were also taken from this area (Figure 2).



Figure 2 - The process of taking soil samples from the territory of an animal burrow located near the outbreak

According to retrospective data, in August 2019, an anthrax outbreak was registered in the village of Olginka, with 5 people and 2 cattle sick. A trip was made to the village of Olginka and visual inspections of the places of slaughter of sick animals were carried out.

The first section, i.e. where a bull was slaughtered Inventory No. KZ C 1 59139012 is located on a pasture 1000-1100 meters west of the village of Olginka.

In 2019, during quarantine measures at both sites, local veterinary specialists carried out arable work along the perimeters within a radius of 25-30 from the animal slaughter center. In the first section (slaughter of a bull Inv. No. KZ C 1 59139012) of the layer, the top soil was removed from the slaughter site with a size of 3 x 4 m for the purpose of further burning in an incinerator.

At present, the inspection has shown that on the pasture where the slaughter of the bull was carried out, a limited area is clearly visible, with a sharply different vegetation, measuring 2.5 x 4.0 m (Figure 3).



Figure 3 - Slaughter site of a sick bull, snapshot of 2022

From the territory of this site, soil samples were taken from the surface and to a depth of up to 40 cm, from 5 points, i.e. envelope method (Figure 4).



Figure 4 - The process of sampling soil from the territory of slaughter of a bull with anthrax

The second animal - a cow (Inv. No. KZ C 1 09015090) was also slaughtered on a pasture at a distance of 2000 m from the village.

An inspection of this territory showed that it is very difficult to establish its exact location, because. This site is located in a cereal field and is currently plowed.

During the epizootological survey, the geographical coordinates of these areas were determined.

It should be noted that a visual inspection of the pasture area showed the presence of a large number of rodent burrows. Their order of location and number indicates the presence of numerous colonies of mole vole (hamster family) and pika (hare-like order).

For microbiological monitoring, the pasture area with the largest number of holes was conditionally divided into several sections, from each of which soil samples were taken, Figure 5. During the epizootological survey, the geographical coordinates of these areas were determined.

It should be noted that a visual inspection of the pasture area showed the presence of a large number of rodent burrows. Their order of location and number indicates the presence of numerous colonies of mole vole (hamster family) and pika (hare-like order).

For microbiological monitoring, the pasture area with the largest number of holes was conditionally divided into several sections, from each of which soil samples were taken (Figure 5).



Figure 5 - Soil sampling from animal burrows located in the pasture the village of Olginka

In total, during the business trip from the territory of 2 soil anthrax foci, adjacent sanitary protection zones and slaughter sites, 212 soil samples were taken.

After the completion of the experiments, all sampling sites were treated with a hot solution of 10% caustic soda.

As a result of the bacteriological studies, 67 isolates were identified that have a similar morphology with the anthrax pathogen. Further laboratory examination showed that isolated cultures formed turbidity in Hottinger's broth, some of them grew with the presence of sediment, growth of flat gray-white matte colonies with fringed edges was noted on a dense medium. All cultures had positive lecithinase and hemolytic activity. The isolates were missing the capsule in vitro and in vivo, there was a positive test with penicillin. Samples with bacteriophage showed negative results.

A bioassay on white mice showed that 19 out of 67 cultures were non-pathogenic for them.

The pathogen *B. anthracis* was not isolated in smears-imprints and inoculations from the organs of dead and slaughtered animals. Additionally, the study of emulsions from the organs of white mice was in RNGA, also showed negative results.

Test results indicate that there is no anthrax pathogen in the samples. At the same time, the established properties of the isolated isolates indicate that the samples contain closely related microorganisms - *Bacillus cereus*.

Conclusion

On the basis of the conducted studies, it can be concluded that these soil foci, on a pasture, pose a certain biological hazard to the population and the environment. The presence of numerous rodent burrows in the slaughter area poses a high risk of bringing the infectious agent to the surface. Microbiological monitoring of soils taken directly from the territory of these foci, adjacent sanitary protection zones and places where diseased animals were cut showed the absence of the pathogen *B. anthracis*.

Taking into account the biological hazard of soil anthrax foci and the high degree of risk, specialists of the sanitary-epidemiological and veterinary services recommended to carry out microbiological monitoring of the soil of these territories annually.

Funding

The work was carried out within the framework of the PTF of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (2021-2023) under the project "Study the epizootological characteristics of the country's territory for anthrax and develop veterinary and sanitary measures to improve their effectiveness."

References:

- 1 Burdelov L.A. *Atlas rasprostranenija osobo opasnyh infekcij v Respublike Kazahstan*. Almaty, 2012: 151-171.
- 2 *Kadastr pochvennyh ochagov sibirskoj jazvy na territorii Respubliki Kazahstan*. Almaty, 2017.
- 3 *Kadastr stacionarno-neblagopoluchnyh po sibirskoj jazve punktov Respubliki Kazahstan* 1948-2002 gg. Astana, 2002.
- 4 Luhnova L.Ju., Pazylov E.K., Meka-Mechenko T.V., Izbanova U.A. i dr. Jepidemiologicheskaja situacija po sibirskoj jazve v 2014 godu v Kazahstane. *Okruzhajushhaja sreda i zdorov'e cheloveka*. 2014, 4: 13-26.
- 5 Badmazhapova R. N. *Mikrobiologicheskij monitoring pochv skotomogil'nikov Respubliki Burjatija*. Avtoref. kand. dis. SPb, 2008.
- 6 Luhnova L.Ju., Izbanova U.A. , Meka-mechenko T.V., Nekrasova L.E., Atshabar B.B., Kazakov V.S. Sibirskaja jazva v 2016 godu v Kazahstane. *Medicina*. 2017, 5 (179): 56-61.
- 7 Manchee, R.J., Broster M.G., Melling J., Henstridge R.M. & Stagg A.J. *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Natur.*, 1981, 294: 254-255.

8 Atshabar B.B., Luhnova L.Ju., Meka-Mechenko T.V., Izbanova U. A., Sushhih V. Ju., Sultanov A. K., Gorelov Ju. M., Abutalip A. A., Zholshorinov A. Zh., Zhumadilova Z. B., Kobzhasarov D.S. *Metodicheskie rekomendacii Organizacija sanitarno-protivojepidemicheskikh i protivojepizooticheskikh meroprijatij pri sibirskoj jazve v Respublike Kazahstan.* Almaty, 2015.

9 Sultanov A.A., Gorelov Ju.M., Sushhih V.Ju. i dr. *Pochvennye ochagi sibirskoj jazvy. Porjadok organizacii i provedenija meroprijatij po podgotovke prob k issledovaniju.* Almaty, 2015.

10 Luhnova L.Ju., Izbanova U.A., Sushhih V.Ju., Turegel'dieva D.A., Abieva A.A., Kunzhan N.U. *Laboratornaja diagnostika sibirskoj jazvy pri issledovanii materiala ot ljudej i zhivotnyh, iz ob#ektov vneshnej sredy.* Almaty, 2020.

11 Prikaz Ministra zdravoohranenija Respubliki Kazahstan ot 12.11. 2021 g. № KZ DSM-114. Zaregistrirovan v Ministerstve justicij Respubliki Kazahstan 15 nojabrja 2021 goda № 25151. Ob utverzhdenii Sanitarnyh pravil "Sanitarno-jepidemiologicheskie trebovaniya k organizacii i provedeniju sanitarno-protivojepidemicheskikh, sanitarno-profilakticheskikh meroprijatij po preduprezhdeniju osobo opasnyh infekcionnyh zabolеваний".

МРНТИ: 34.25.23; 34.25.39; 68.41.53

С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ^{1*}, Т.Б. САБЫРЖАН¹, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹,
Н.Н. АХМЕТСАДЫКОВ², М.Н. АХМЕТЖАНОВА², Ж.М. БАТАНОВА²,
Е.Я. ХАН¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. КЫДЫРМАНОВ¹

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

² Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматинская область, Казахстан

*e-mail: nuralibekovs@mail.ru

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА А В ПОПУЛЯЦИИ ЛОШАДЕЙ ЮЖНОГО КАЗАХСТАНА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.13

Аннотация

В статье описываются подтипы вируса гриппа, вызывающие инфекции среди лошадей, приводится историческая справка об эпизоотиях лошадиного гриппа А, приведены данные о зарегистрированных случаях на территории Казахстана. Описаны данные по серологическому исследованию распространенности гриппа А среди лошадей Туркестанской области.

Ключевые слова: вирус гриппа, эпизоотия, серология, лошади, грипп лошадей.

Грипп лошадей – острое, высококонтагиозное респираторное заболевание семейства лошадиных (Equidae). Возбудители гриппа лошадей – два подтипа вируса: Influenza A/equine2 (H3N8) и Influenza A/equine1 (H7N7) [1, 2]. Вирус гриппа лошадей (ВГЛ) впервые выделен и описан в 1956 г. во время крупной эпизоотии в Чехословакии [3]. Прототипный вирус A/лошадь/Прага/56 имел антигennую формулу H7N7; последняя вспышка, вызванная этим возбудителем, зарегистрирована в 1979 г. В 1963 г. другой, антигенно отличающийся вариант вируса гриппа, подтипа H3N8, вызвал крупную эпизоотию в США [4, 5]. Прототипный вирус A/лошадь/Майами/63 попал в восприимчивую популяцию животных вместе с импортированными лошадьми из Аргентины [6]. Вирусы гриппа (ВГ), циркулирующие в настоящее время среди лошадей во всем мире, относятся к подтипу H3N8 [1]. Инфекция гриппа лошадей, вызываемая подтипов H7N7, в настоящее время не регистрируется [2]. В 1987 г. вирусы гриппа подтипа Influenza A/equine2 (H3N8) разделены на две самостоятельные эволюционные линии, которые циркулируют в настоящее время: Европейский тип и Американский тип [1, 7]. Второе разделение произошло в начале 2000-х годов, когда возникли представленные до настоящего времени, так называемые Флоридские клады 1 и 2 [8].

Ситуация по ВГЛ в мире остается напряженной: по данным МЭБ широкомасштабные эпизоотии зарегистрированы в Европе (Италия, Эстония) в 2020 г. В 2018–2019 гг. выявлено 299 очагов заболеваний гриппом лошадей в Африке (Нигерия, Сенегал). В 2018 г. вспышки так же зарегистрированы в Латинской Америке (Колумбия, Эквадор) [9].

Грипп лошадей в Республике Казахстан – актуальная проблема в области ветеринарии. Так, в 2007 г. её эпизоотии были зарегистрированы в Южно-Казахстанской, Жамбылской, Алматинской, Карагандинской и Восточно-Казахстанской областях. В августе 2007 г. в коневодческих хозяйствах Алматинской области в ходе массовых респираторных заболеваний и гибели лошадей выделено пять изолятов вируса подтипа H3N8 [10].

Вспышки ВГЛ в РК также отмечались на территории Жамбылской, Костанайской и Южно-Казахстанской областей в 2012 г. [7, 11].

В 2020 г. была зарегистрирована массовая вспышка респираторного заболевания среди непарнокопытных на юге и юго-востоке Казахстана. Клинические признаки характеризовались наличием сильного кашля животных, наиболее тяжелые случаи

наблюдались у ослов (некоторые с летальным исходом). В ходе вирусологического исследования был изолирован вирус гриппа A/H3N8 от пораженных лошадей и ослов [12]. Данная статья посвящена серологическому анализу степени распространенности гриппа А среди лошадей Туркестанской области.

Материалы и методы

Материалы в виде сывороток крови собраны от 98 голов лошадей в различных коневодческих хозяйствах Туркестанской области в июне 2022 г. Исследования на животных проводились в соответствии с протоколом одобренным местным комитетом по этике научно-производственного центра микробиологии и вирусологии.

Пробы крови для исследований отбирались с помощью вакуумных пробирок системы BD Vacutainer® из яремной вены (*venae jugulares*) лошадей. Место инъекции предварительно дезинфицировали 70%-ным этанолом. Для забора крови использовали иглы размерами 18G×50 мм.

Образцы крови центрифугировали (15 мин при 3000 оборотов/мин), полученную плазму переносили в криостойчивые полипропиленовые пробирки и транспортировали в жидком азоте (-196°C).

Для обнаружения антител к вирусу гриппа сыворотки лошадей протестираны в иммуноферментном анализе (ИФА) с набором, блокирующими нуклеопротеид вируса гриппа А (IDEXX InfluenzaA Ab Test Kit, США). Все этапы работы выполнили согласно инструкции изготовителя. Образцы сывороток предварительно были разведены 1:10 в входящем в наборе буфере для разбавления. Анализ результатов выполнен с применением микропланшетного ридера (Infinite 200 PRO, Tecan, Швейцария) с длиной волны 650 нм. Полученные результаты оценивались путем расчёта отношения значения оптической плотности (ОП) образца к значению ОП отрицательного контроля. Пробы сывороток с оптической плотностью меньше 0,6 считались положительными.

Далее пробы сывороток, положительные в ИФА на наличие IgG к NP белку вируса гриппа А, дополнительно исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) для идентификации антител (антигемагглютинов) к подтипам гемагглютининов (НА) [13]. Анализ РТГА проводили на микротитровальных планшетах с использованием 0,5% взвеси куриных эритроцитов и 4 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) доступных вирусных антигенов: А/свинья/Алматы/87/2014 (H1N1), А/озерная чайка/Атырау/2010 (H1N2), А/утка/Калифорния/72 (H3N8), А/фламинго/Актау/6570/2015 (H5N1), А/FPV/Росток/34 (H7N7), А/лебедь-кликун/Сорбулак/7994/2019 (H9N2) А/шилохвость/Северный Казахстан/6401/2014 (H10N7). Реакция сопровождалась контролем антигена, эритроцитов и испытуемых сывороток. Серопозитивными в РТГА считали сыворотки крови, ингибирующие гемагглютинирующую активность референсных и казахстанских вариантов вирусов гриппа А с различными подтипами НА в титрах 1:20 и более.

Результаты и обсуждение

Проведены серологические исследования в ИФА 98 сывороток лошадей, собранных в 2022 году на присутствие антител к вирусам гриппа А.

Результаты анализа сывороток приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты иммуноферментного анализа сывороток

Район сбора сывороток	Количество исследованных сывороток	Количество положительных сывороток на ИФА	РТГА+
1	2	3	4
Арысь	10	5	0

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Байдибек би	30	1	1
Казыгурт	10	2	2
Отырар	10	6	6
Рыскулова	10	2	2
Сарыагаш	18	3	3
Толе би	10	1	1

Как видно из таблицы, в сыворотках крови лошадей, собранных в 2022 г., антитела к NP-белку вируса гриппа А обнаружены в 20 из 98 образцов (20,4%), что указывает на интенсивную экспозицию вирусом гриппа лошадей Туркестанской области: в Арыске и в Отырарском районе процент положительных проб составлял 50% и 60%, соответственно.

В РТГА осуществлена дифференциация подтипов антигемагглютининов ИФА-положительных на NP-белок ВГ А сывороток лошадей с помощью набора антигенов к семи различным подтипам вируса А.

Способность к гемагглютинации сывороток до $\frac{1}{2}$ гомологичного титра нейтрализовалась референсным вариантом вируса Н3 (таблица 2).

Таблица 2 - Наличие специфических антигемагглютининов к вирусам гриппа А в сыворотках крови лошадей, собранных в Туркестанской области в 2022 г.

Название ИФА положительных сывороток лошадей	Антигены вируса гриппа А подтипов						
	H1N1	H1N2	H3N8	H5N1	H7N7	H9N2	H10 N7
Арысь / 3	40	—	—	—	—	—	—
Арысь / 6	40	—	—	—	—	—	—
Арысь / 7	40	—	—	—	—	—	—
Арысь / 10	40	—	—	—	—	—	—
Арысь / 20	40	—	—	—	—	—	—
Байдибек би / 4	—	—	160	—	—	—	—
Казыгурт / 17	—	—	640	—	—	—	—
Казыгурт / 41	—	—	640	—	—	—	—
Отырар / 8	—	—	640	—	—	—	—
Отырар / 10	—	—	640	—	—	—	—
Отырар / 11	—	—	640	—	—	—	—
Отырар / 13	—	—	320	—	—	—	—
Отырар / 15	—	—	640	—	—	—	—
Отырар / 17	—	—	640	—	—	—	—
Рыскулова / 20	—	—	640	—	—	—	—
Рыскулова / 27	—	—	640	—	—	—	—
Сарыагаш / 3	—	—	320	—	—	—	—
Сарыагаш / 5	—	—	640	—	—	—	—
Сарыагаш / 9	—	—	160	—	—	—	—
Толе би / 7	—	—	320	—	—	—	—

В результате исследований в РТГА антитела к вирусам гриппа А с подтипами НА: Н1, Н5, Н7, Н10 – в сыворотках не выявлены. Антигемагглютинины к вирусу А/лошадь/ЮКО/236/2012 (Н3Н8) обнаружены в сыворотках лошадей всех административных районов, кроме г. Арысь, в титрах 1:160-1:640. Десять сывороток, показавших наивысший титр, собраны от животных Казыгуртского, Отырарского, Рыскуловского, Сарыагашского районов Туркестанской области.

Способность к гемагглютинации изолята А/свинья/Алматы/87/2014 (Н1Н1) в титрах 1:40 нейтрализовалась пятью сыворотками, выделенными из г. Арысь Туркестанской

области. При этом, данные образцы не распознавались антисыворотками к подтипу А/озерная чайка/Атырау/4378/10 (H1N2). Следовательно, подавление НА вируса было вызвано не специфическим к H1 антигемагглютинином, а стерическим эффектом нейраминидазы вируса, которые взаимодействуют с антителами при постановке РТГА. В связи с этим, можно предположить, что у пяти вышеуказанных сывороток отсутствовали антигемагглютинины ко всем вирусам, взятым в эксперимент. Это свидетельствует о возможности инфицирования лошадей ВГ А подтипами H4, H6, H8, H12, либо об их заражении ранее неизвестными вариантами вируса гриппа.

За последние два года в Туркестанской области отсутствовали официальные сообщения о вспышках ВГЛ. У всех лошадей не наблюдалось признаков заболевания, отсутствовал кашель; болезнь проходила без сильных симптомов. Наличие антител к вирусу гриппа А/H3 в сыворотках лошадей указывает на вероятность инфицирования животных эпизоотически актуальным вариантом вируса. Далее, учитывая высокие титры антител к серотипу А/лошадь/ЮКО/236/2012 (H3N8), можно сделать вывод о недавней циркуляции вируса гриппа А в популяции лошадей Туркестанской области без выраженных респираторных симптомов.

Финансирование

Исследование финансируется Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (ПЦФ BR10764975 «Разработать и предложить для производства средства и методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных и обеззараживания почвенных сибиреязвенных очагов»).

Литература:

- 1 Lai A.C., Chambers T.M., Holland R.E., Jr Morley P.S., Haines D.M., Townsend H.G., & Barrandeguy M. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Archives of virology*, 2001, 146(6):1063-1074 (DOI: 10.1007/s007050170106).
- 2 Karamendin K., Kydyrmanov A., SayatovM., Strochkov V., Sandybayev N., Sultankulova K., Retrospective Analysis of the Equine Influenza Virus A/Equine/Kirgizia/26/1974 (H7N7) Isolated in Central Asia. *Pathogens*, 2016, 5(3):55 (doi:10.3390/pathogens5030055).
- 3 Sovinová O., Tumová B., Pouska F. et al Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol*, 1958, 2(1):52-61.
- 4 Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1963, 143:587-90.
- 5 Жуматов К. Х., Саятов М. Х. Антигенный дрейф и молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа А/H3 диких птиц, млекопитающих животных и человека. *Вестник Национальной Академии наук РК*, 2013, 2:31-38.
- 6 Scholtens R.G., Steele J.H. U.S. epizootic of equine influenza, 1963. *Public Health Rep. – Washington*, 1964, 79(5):393-402.
- 7 Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Khan E., Daulbayeva K., Asanova S., Zhumatov K., Seidalina A., Sayatov M., Fereidouni S.R. Continuing evolution of equine influenza virus in Central Asia, 2007-2012. *Arch Virol.*, 2014, 159(9):2321-7 (doi: 10.1007/s00705-014-2078-3).
- 8 OIE. Conclusions and recommendations from the Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines. *Office International des Epizooties Bulletin*, 2008, 2:42-45.
- 9 OIE. 2020. <http://www.oie.int>
- 10 Кыдырманов А.И., Кумекбаева Ж.Ж., Карамендин К.О. и др. Изоляция вируса гриппа А (H3N8) от лошадей в Казахстане в 2007 г. *Ветеринария*, 2009, 1(5):52-54.
- 11 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Sansyzbay A., Sandybayev N., Nurabayev S., Savitskaya I., Rock D.L., Tulman E.R. Complete Genome Sequencing of Two Equine Influenza A(H3N8) Virus Strains Isolated in Kazakhstan. *Genome Announc*, 2018, 6(26):e00574-18 (doi: 10.1128/genomeA.00574-18).
- 12 Khan Y., Suleymenova S., Kassymbekov Y., Karamendin K., Daulbayeva K., Yessentureeva M. and Kydyrmanov A. Equine influenza outbreaks in Kazakhstan in 2020. *Equine veterinary Journal*, 2021, 53(S56):74 (https://doi.org/10.1111/evj.114_13495).

13 Pedersen JC. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol.*, 2014, 1161:11-25 (doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2).

С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ^{1*}, Т.Б. САБЫРЖАН¹, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹,
Н.Н. АХМЕТСАДЫКОВ², М.Н. АХМЕТЖАНОВА², Ж.М. БАТАНОВА²,
Е.Я. ХАН¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹

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

² «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Алматы облысы, Қазақстан

*e-mail: nuralibekovs@mail.ru

ОҢТҮСТИК ҚАЗАҚСАНДАҒЫ ЖЫЛҚЫЛАР АРАСЫНДАҒЫ А ТҮМАУ ВИРУСЫ АЙНАЛЫМЫНА СЕРОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГ ЖҮРГІЗУ

Түйін

Мақалада жылқылар арасында жұқпалы ауру тудыратын тұмау вирусының типтармақтары сипатталған, жылқы тұмауының А эпизоотиясы туралы тарихи мәліметтер берілген және Қазақстанда тіркелген жағдайлар туралы деректер жарияланған. Түркістан облысындағы жылқылар арасында А тұмауының таралуын серологиялық зерттеу деректері сипатталған.

Кілтті сөздер: тұмау вирусы, эпизоотия, серология, жылқы, жылқы тұмауы.

IRSTI: 34.25.23; 34.25.39; 68.41.53

S.Sh.NURALIBEKOV^{1*}, T.B. SABYRZHAN¹, Ye.T. KASSYMBEKOV¹,
N.N. AKHMETSAKYOV², M.N. AKHMETZHANOVA², Zh.M. BATANOVA²,
Ye.Ya. KHAN¹, K.O. KARAMENDIN¹, A.I. KYDYRMANOV¹

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

² Research and production enterprise "Antigen", Almaty region, Kazakhstan

*e-mail: nuralibekovs@mail.ru

SEROLOGICAL MONITORING OF INFLUENZA A VIRUS CIRCULATION AMONG HORSES OF SOUTHERN KAZAKHSTAN

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.13

Abstract

The article describes the influenza A virus subtypes that cause equine influenza infections; provides a chronicles of equine influenza epizootics and demonstrates the data on registered cases in Kazakhstan. Data on a serological study of the prevalence of influenza A among horses of the Turkestan region are described.

Keywords: influenza virus, epizootic, serology, horses, equine influenza.

Equine influenza is an acute, highly contagious respiratory disease of the *Equidae* family. Equine influenza is caused by two subtypes of the virus: Influenza A/equine2 (H3N8) and Influenza A/equine1 (H7N7) [1, 2]. Equine influenza virus (EIV) was first isolated and described in 1956 during a major epizootic in Czechoslovakia [3]. The prototype virus A/Equine/Prague/56 had the antigenic formula H7N7; the last outbreak caused by this pathogen was registered in 1979. In 1963, another antigenically different variant of the H3N8 influenza virus caused a major epizootic in the United States [4, 5]. The prototype A/Equine/Miami/63 virus entered the susceptible animal population along with imported horses from Argentina [6]. Influenza viruses

(IV) currently circulating in horses worldwide are of the H3N8 subtype [1]. Equine influenza infection caused by the H7N7 subtype is not currently reported [2]. In 1987, influenza viruses of the Influenza A/equine2 (H3N8) subtype were divided into two independent evolutionary lineages that are currently circulating: the European type and the American type [1, 7]. The second separation occurred in the early 2000s, when the so-called Florida clades 1 and 2, presented to date, emerged [8].

The situation with EIV in the world remains intensive: according to the OIE, large-scale epizootics were registered in Europe (Italy, Estonia) in 2020. In 2018-2019, 299 outbreaks of equine influenza were identified in Africa (Nigeria, Senegal). In 2018, outbreaks were also registered in Latin America (Colombia, Ecuador) [9].

Equine influenza in the Republic of Kazakhstan remains an urgent problem in the field of veterinary medicine. So, in 2007, its epizootics were registered in South Kazakhstan, Zhambyl, Almaty, Karaganda and East Kazakhstan regions. In August 2007, five isolates of the H3N8 subtype virus were isolated in horse breeding farms in the Almaty region during mass respiratory diseases and death of horses [10].

Outbreaks of EIV in the Republic of Kazakhstan were also registered on the territory of Zhambyl, Kostanai and South Kazakhstan regions in 2012 [7, 11].

In 2020, a massive outbreak of a respiratory disease was registered among equids in the south and southeast of Kazakhstan. Clinical signs were characterized by the presence of severe coughing of animals, the most severe cases were observed in donkeys (some fatal). During virological study, influenza A/H3N8 virus was isolated from affected horses and donkeys [12]. This article is devoted to a serological analysis of the prevalence of influenza A among horses in the Turkestan region.

Materials and methods

Blood sera were collected from 98 horses in various locations of the Turkestan region, in June 2022. Animal studies were carried out in accordance with the protocol approved by the local ethics committee of the Research and Production Center for Microbiology and Virology.

Blood samples for analysis were taken using vacuum tubes of the BD Vacutainer® system from the jugular vein (*venae jugulares*) of horses. The injection site was preliminarily disinfected with 70% ethanol. For blood sampling, 18G × 50 mm needles were used.

Blood samples were centrifuged (15 min at 3000 rpm), the resulting plasma was transferred into cryoresistant polypropylene vials and transported in liquid nitrogen (-196°C).

To detect antibodies to the influenza virus, horse sera were tested in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a kit that blocks the influenza A virus nucleoprotein (IDEXX InfluenzaA Ab Test Kit, USA). All work steps were performed according to the manufacturer's instructions. Serum samples were previously diluted 1:10 in the dilution buffer included in the kit. The results were analyzed using a microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) with a wavelength of 650 nm. The results obtained were evaluated by calculating the ratio of the optical density (OD) value of the sample to the OD value of the negative control. Optical density in sera, where values <0.6 were considered positive.

Further, serum samples positive in ELISA for the presence of IgG to the NP protein of the influenza A virus were additionally examined in the hemagglutination inhibition (HI) assay to identify antibodies (antihemagglutins) to hemagglutinin (HA) subtypes [13]. HI analysis was performed on microtiter plates using 0.5% chicken erythrocyte suspension and 4 hemagglutination units (HAU) of available viral antigens: A/pig/Almaty/87/2014 (H1N1), A/black-headed gull/Atyrtau/2010 (H1N2), A/duck/California/72 (H3N8), A/flamingo/Aktau/6570/2015 (H5N1), A/FPV/Rostock/34 (H7N7), A/whooper swan/Sorbulak/7994/2019 (H9N2), A/pintail/Northern Kazakhstan/6401/2014 (H10N7);. The reaction was accompanied by control of the antigen, erythrocytes and test sera. Seropositive in HI assay was considered sera that inhibited the hemagglutinating activity of reference and Kazakh variants of influenza A viruses with different HA subtypes in titers of 1:20 or more.

Results and discussion

Serological studies were carried out in ELISA of 98 horse sera collected in 2022 for the presence of antibodies to influenza A viruses.

The results of the analysis of sera are shown in table 1.

Table 1 - Results of enzyme-linked immunosorbent assay of sera

Serum collection area	Number of tested sera	Number of positive sera for ELISA	HI assay +
Arys	10	5	0
Baidibek bi	30	1	1
Kazygurt	10	2	2
Otyrar	10	6	6
Ryskulov	10	2	2
Saryagash	18	3	3
Tole bi	10	1	1

As can be seen from the table, in the blood sera of horses collected in 2022, antibodies to the NP protein of the influenza A virus were found in 20 of 98 samples (20.4%), which indicates an intense exposure to the equine influenza virus in the Turkestan region: in Arys and in Otyrar district, the percentage of positive samples was 50% and 60%, respectively.

In HI assay, differentiation of subtypes of antihemagglutinins was carried out by ELISA-positive for NP-protein HA of horse sera using a set of antigens to seven different subtypes of Influenza A virus.

The ability to hemagglutinate sera up to $\frac{1}{2}$ of the homologous titer was neutralized by the reference variant of the H3 virus (Table 2).

Table 2 - Presence of specific antihemagglutinins to influenza A viruses in horse blood sera collected in the Turkestan region in 2022

Name of ELISA positive horse sera	Antigens of influenza A virus subtypes						
	H1N1	H1N2	H3N8	H5N1	H7N7	H9N2	H10 N7
Arys / 3	40	—	—	—	—	—	—
Arys / 6	40	—	—	—	—	—	—
Arys / 7	40	—	—	—	—	—	—
Arys / 10	40	—	—	—	—	—	—
Arys / 20	40	—	—	—	—	—	—
Baidibek bi / 4	—	—	160	—	—	—	—
Kazygurt / 17	—	—	640	—	—	—	—
Kazygurt / 41	—	—	640	—	—	—	—
Otyrar / 8	—	—	640	—	—	—	—
Otyrar / 10	—	—	640	—	—	—	—
Otyrar / 11	—	—	640	—	—	—	—
Otyrar / 13	—	—	320	—	—	—	—
Otyrar / 15	—	—	640	—	—	—	—
Otyrar / 17	—	—	640	—	—	—	—
Ryskulov / 20	—	—	640	—	—	—	—
Ryskulov / 27	—	—	640	—	—	—	—
Saryagash / 3	—	—	320	—	—	—	—
Saryagash / 5	—	—	640	—	—	—	—
Saryagash / 9	—	—	160	—	—	—	—
Tole bi / 7	—	—	320	—	—	—	—

As a result of the study in HI assay, antibodies to influenza A viruses with subtypes HA H1, H5, H7, H10 were not detected in sera. Antihemagglutinins to the A/equine/South Kazakhstan/236/2012 (H3N8) virus were found in the sera of horses from all administrative districts, except for the town of Arys, in titres of 1:160-1:640. Ten sera, which displayed the highest titer, were collected from animals of the Kazygurt, Otyrar, Ryskulov, Sarygash regions of the Turkestan region.

The ability to hemagglutinate isolate A/swine/Almaty/87/2014 (H1N1) in credits 1:40 was neutralized by five sera isolated from the city of Arys, Turkestan region. At the same time, these samples were not recognized by antisera to subtype A/black-headed gull/Atyrau/4378/10 (H1N2). Therefore, the inhibition of the HA virus was not caused by H1-specific antihemagglutinin, probably by the hindrance of the virus neuraminidase, which interacts with antibodies during HI assay. In this regard, it can be assumed that the five above-mentioned sera lacked antihemagglutinins to all viruses taken in the experiment. This indicates the possibility of infection of horses with influenza A virus subtypes H4, H6, H8, and H12, or previously unknown variants of the influenza virus.

Over the past two years, there have been no official reports of EIV outbreaks in the Turkestan region. Any of the horses showed signs of disease, and no cough; the disease course characterized without severe symptoms. The presence of antibodies to the A/H3 influenza virus in the horse sera indicates the likelihood of infection of animals with an epizootic strain of the virus. Further, taking into account the highest titers of antibodies to the serotype A/equine/South Kazakhstan/236/2012 (H3N8), we can assume that the influenza A virus has recently circulated in the horse population of the Turkestan region without expression of severe respiratory symptoms.

Funding

The study is funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (PCF BR10764975 "To develop and propose for production means and methods for diagnosing, preventing diseases, treating infected animals and decontaminating soil anthrax foci").

References:

- 1 Lai A.C., Chambers T.M., Holland R.E., Jr Morley P.S., Haines D.M., Townsend H.G., & Barrandeguy M. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Archives of virology*, 2001, 146(6):1063-1074 (DOI: 10.1007/s007050170106).
- 2 Karamendin K., Kydyrmanov A., Sayatov M., Strochkov V., Sandybayev N., Sultankulova K., Retrospective Analysis of the Equine Influenza Virus A/Equine/Kirgizia/26/1974 (H7N7) Isolated in Central Asia. *Pathogens*, 2016, 5(3):55 (doi:10.3390/pathogens5030055).
- 3 Sovinová O., Tumová B., Pouska F. et al Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol*, 1958, 2(1):52-61.
- 4 Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1963, 143:587-90.
- 5 Zhumatov K. H., Sayatov M. H. Antigennyj drejf i molekulyarno-geneticheskaya izmenchivost' virusov grippa A/H3 dikh ptic, mlekopitayushchih zhivotnyh i cheloveka. *Vestnik Nacional'noj Akademii nauk RK*, 2013, 2:31-38.
- 6 Scholtens R.G., Steele J.H. U.S. epizootic of equine influenza, 1963. *Public Health Rep. - Washington*, 1964, 79(5):393-402.
- 7 Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Khan E., Daulbayeva K., Asanova S., Zhumatov K., Seidalina A., Sayatov M., Fereidouni S.R. Continuing evolution of equine influenza virus in Central Asia, 2007-2012. *Arch Virol.*, 2014, 159(9):2321-7 (doi: 10.1007/s00705-014-2078-3).
- 8 OIE. Conclusions and recommendations from the Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines. *Office International des Epizooties Bulletin*, 2008, 2:42-45.
- 9 Equine influenza. OIE 2020. Access mode: <http://www.oie.int> (Accessed: 12/20/2022).
- 10 Kydyrmanov A.I., Kumekbaeva Zh.Zh., Karamendin K.O. i dr. Izolyaciya virusa grippa A (H3N8) ot loshadej v Kazahstane v 2007 g. *Veterinariya*, 2009, 1(5):52-54.
- 11 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Sansyzbay A., Sandybayev N., Nurabayev S., Savitskaya I., Rock D.L., Tulman E.R. Complete Genome Sequencing of Two Equine

Influenza A(H3N8) Virus Strains Isolated in Kazakhstan. *Genome Announc*, 2018, 6(26):e00574-18 (doi: 10.1128/genomeA.00574-18).

12 Khan Y., Suleymenova S., Kassymbekov Y., Karamendin K., Daulbayeva K., Yessentureeva M. and Kydyrmanov A. Equine influenza outbreaks in Kazakhstan in 2020. *Equine veterinary Journal*, 2021, 53(S56):74 (https://doi.org/10.1111/evj.114_13495).

13 Pedersen JC. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol.*, 2014, 1161:11-25 (doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2).

FTAMP: 62.99.39

С.Н. СЕЙЛБЕК, М. ТОРТАЙ, Н.Р. АКМУХАНОВА*, Ф.К. САРСЕКЕЕВА,
Д.К. КИРБАЕВА, Н.Е. БИДАҒҰЛОВА, Н.А. АЛТЫБАЕВА, А.Б. ЕЛАМАНОВА
әл-Фараби атындағы Қазақ Үлттүк Университеті, Алматы, Қазақстан
*e-mail: akmukhanova.nurziya@gmail.com

**АҚДАЛА ЕГІС АЛҚАПТАРЫНЫҢ МИКРОБАЛДЫРЛАР БИОАЛУАНТҮРЛІЛІГІ
ЖӘНЕ БАКТЕРИЯЛАРҒА ҚАРСЫ БЕЛСЕНДІЛІГІ БАР
ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАРДЫ БӨЛПІ АЛУ**

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.14

Түйін

Алматы облысындағы Ақдала алабының егістік алқаптарындағы цианобактериялар мен микробалдырлардың түрлік әртүрлілігі зерттелді. Микроорганизмдердің биоалуантүрлілігі болашағы мол жаңа микроб түрлерін табу үшін ең үлкен пайдаланылмаған резервуар болып табылады. Зерттеудің мақсаты микробалдырлар мен цианобактериялардың әртүрлілігін зерттеу және цианобактериялардың болашағы мол түрлерін бөліп алу болып саналады. Зерттеу нәтижелері бойынша Ақдала алабының егіс алқаптарының топырақ үлгілерінен микробалдырлар мен цианобактериялардың 48 түрі анықталды, оның ішінде 21 түрі - цианобактериялар. Цианобактериялар өкілдерінің негізгі үлесі гетероцисталы формалар болды. Цианобактериялардың анықталған түрлерінен 5 альгологиялық таза дақылдары бөлініп алынды, бірақ бактериологиялық таза дақыл ретінде антибиотиктермен өңдеуден кейін 4 дақылдар бөлініп алынады. Зерттеу нәтижелері бойынша бөлініп алынған төрт цианобактерия дақылдарының арасынан максималды бактерияға қарсы белсенділікті көрсеткен - *Oscillatoria SP S-3, Anabaena SP S-5* дақылдары болды. Аталған дақылдардың метанол сынғындылары *E. coli* және *Staphylococcus aureus, B. subtilis* сынақ штаммдарының есүін тәжеудің ең үлкен аймақтарын көрсетті. Цианобактериялар әртүрлі биотехнологиялық маңызды қосылыстардың көп мөлшерін алу үшін орасан зор, бірақ елі де аз зерттелген ресурс болып табылады, ойткені олар әртүрлі биологиялық белсенді заттарды синтездейді, олар саңырауқұлақтарға қарсы, бактерияларға қарсы, вирустарға қарсы белсенділікке ие. Цианобактериялардың жаңа түрлерін іздеу, оқшаулау және биологиялық белсенді заттарды өндірушілерді дұрыс таңдау агробиотехнологияда үлкен мүмкіндіктер ашады.

Кілтті сөздер: биоалуантүрлік, микробалдырлар, цианобактериялар, альгологиялық таза дақылдар, бактерияларға қарсы белсенділік.

Топырақтың органикалық заттарының түзілуі микроорганизмдердің тікелей қатысуымен жүреді, олардың өсімдіктер мен жануарлардың қалдықтарына көпжақты әсері көптеген биохимиялық реакциялармен сипатталады. Жоғары сатыдағы өсімдіктерден бос кеңістіктерді толтыра отырып, цианобактериялар күн энергиясының ассимиляциясының факторы және қосымша биомасса көзі ретінде қызмет етеді [1]. Олар топырақтардың қалыптасуына қатысады, ал қалыптасқан топырақтардың физико-химиялық қасиеттеріне әсер етеді. Топырақтағы цианобактериялардың қызметі органикалық заттарды өндіру, атмосфералық азотты бекіту, фосфор мен басқа элементтердің қолжетімділігін арттыру, фитогормондар мен токсиндерді шығару, шырышты заттар мен жіп тәрізді талломдар арқылы эрозияға қарсы белсенділік көрсету қабілетімен анықталады [2]. Цианобактериялар өндіретін компоненттер антиоксиданттар мен пигменттер болып табылады. Соның ішінде фукоксантин, каротиноидтар, лютеин, β-каротин, астаксантин және фикобил белоктары), ұзын тізбекті поліканықпаған май қышқылдары (FA-PUFAs) және акуыздар (маңызды аминқышқылдары метионин, треонин және триптофан). Бұл екіншілік метаболиттер тамак, жем, ауыл шаруашылығы және фармацевтика өнеркәсібінде кеңінен қолданылады [3].

Цианобактериялардың әртүрлі түрлері бактерияға қарсы және саңырауқұлаққа қарсы қасиеттері бар жасушаішлік және жасушадан тыс метаболиттерді шығаратыны белгілі [4]. Бактерияларға қарсы агенттер бактериялық инфекцияларды емдеуде кеңінен қолданылады,

бірақ бактериялар қолданыстағы дәрі-дәрмектерге төзімділікке ие болуы мүмкін. Осы себепті зерттеушілер бактерияға қарсы жаңа қосылыстарды анықтау үшін табиғи қосылыстарды іздей бастады [5]. Цианобактериялар осы саладағы болашағы мол биологиялық ресурс ретінде қарастырылады.

Цианобактериялар күріш алқаптарындағы микробтық қауымдастықтың негізгі құрамдас бөлігі болып табылады. Ауылшаруашылық экожүйелерінің құнарлылығына ықпал етеді және жасушалық метаболизмге қажет емес қосылыстардың, яғни екінші реттік метаболиттердің әлеуетті көзі болып табылады [6]. Цианобактерияларды қолданудың кейбір ықтимал бағыттары фармацевтика өнеркәсібі мен ауылшаруашылық секторы үшін бактерияларға қарсы қосылыстарды биотыңайтқыштар мен биобақылау құралдары ретінде өндіру болып табылады. Бактерияларға қарсы заттар мен басқа да фармакологиялық белсенді қосылыстарды синтездеуге қабілетті цианобактерияларды бөліп алу және скрининг жасау жаңа агрохимиялық агенттердің әлеуетті көзі ретінде қызығушылықтың артуын тудырады [7]. Осыған байланысты біздің зерттеу жұмысымыздың мақсаты Алматы облысындағы Ақдала алқабының егіс алқаптарындағы цианобактериялар мен микробалдырлардың түрлік әртурлілігін зерттеу және цианобактериялардың перспективті түрлерін бөліп алу болып табылады.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу нысаны Иле өзенінің сағасында орналасқан Ақдала күріш егу алқабы болып табылады.

Топырақ сынамаларын алу конверт әдісі бойынша жүргізілді [8]. Барлығы 28 альгологиялық сынама жиналды. Жиналған барлық сынамалар мұқият таңбаланды. Жапсырмаларда сынама нөмірі, жинау уақыты мен орны және жинаушының тегі көрсетіледі. Зерттеу барысында альгологиялық тәжірибеде жалпы қабылданған әдістерді қолдана отырып, далалық жиындар мен зертханалық талдаулар жүргізілді. Цианобактериялардың сапалық құрамы шыныға бекініп өсу әдісімен талданды. Ол үшін топырақ сынамалары BG-11 ортасымен ылғалдандырылған Петри табақтарына салынады, және бетіне жабынды шынылар топырақпен толық байланыста болатындей етіп орналастырылды. Петри табақшалары табиғи жарықта және бөлме температурасында 30 тәулік инкубацияланған кейін, шыныларға бекініп өскен цианобактерияларға микроскопиялық бақылау жүргізілді. Цианобактериялар мен микробалдырлар 40, 100 есе үлкейткіш «Premere» және "MicrosAustria" жарық микроскоптарының көмегімен зерттелді. Әрбір су үлгісінен кем дегенде 10 препараттан шамамен 30-40 көру өрісі қаралды.

Алынған нәтижелер 1 мл судағы жасушалар саны ретінде көрсетілді. Цианобактериялар және микробалдырлардың саны 100 көру өрісін қайта есептеу кезінде жиілік шкаласы бойынша бағаланды [9]. Цианобактериялар мен микробалдырлардың түрлерін анықтау жасушалардың жанышылған тамшы және бекітілген препараттарда зерттелді. Фиксатор ретінде формальдегид пен йод ерітінділері пайдаланылды. Цианобактериялар мен микробалдырлардың түрлері анықтауыштарды қолдану арқылы анықталды [10, 11].

Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу дәстүрлі әдістеме бойынша жүргізілді. Альгологиялық таза дақылдарды оқшаулау үшін стандартты микробиологиялық әдістер қолданылды [12]. Цианобактериялар стерильді жағдайда 500 мл колбада өсірілді. Громов, Заррук, BG-11 минералды қоректік оргалары қолданылды.

Цианобактериялардың сырғындыларын алу үшін оқшауланған дақылдардың құргақ биомассасы алынды. Кептірілген үлгілер залалсызданған ұнтағышпен ұнтақталды. Содан кейін 0,5 г ұсақталған үлгіні 10 мл еріткіштермен (метанол, этанол) араластырып, толық экстракция үшін айналмалы шайқауышта бөлме температурасында ұсталды. 4000 айн/мин 15 минут ішінде сырғындылар центрифугаланып, төмен қысымда 50°C температурада концентрацияланып, Концентрацияны экстракциялау үшін пайдаланылған еріткішті

пайдаланып 1 мг/мл-ге дейін жеткізілді және бактерияға қарсы белсенділікке анықтау жүргізілді [13].

Оқшауланған цианобактерия дақылдарының бактерияларға қарсы белсенділігі әл-Фараби атындағы ҚазҰУ биотехнология кафедрасының дақылдар коллекциясынан алынған микроорганизмдердің төрт түріне зерттелді: грамтеріс таяқшалар факультативті анаэробты *Escherichia coli* және аэробты *Pseudomonas aeruginosa*, аэробты грам-оң спора түзетін таяқшалар *Bacillus subtilis* және факультативті-анаэробты грам-оң коктар *Staphylococcus aureus*. Бактерияларға қарсы белсенділік агарға диффузия әдісін қолдану арқылы анықталды [14]. Зерттеу үшін ет-пептон агарында (ЕПА) 24 сағат бойы 37°C температурада алдын ала өсірілген микроорганизмдердің таза дақылдары қолданылды. Стандартты бактериялық суспензия стерильді 0,9% натрий хлориді ерітіндісінде дайындалды. Ол үшін бактериологиялық ілмек арқылы зерттелетін дақыл стерильді тұзды ерітіндісі бар стерильді пробиркаларға енгізіледі және микроорганизмдердің концентрациясын McFarland бойынша лайлану стандартының 0,5 бірлігіне дейін жеткізіледі. Балқытылған және 56°C дейін салқынданылған ЕПА ортасы Петри табақшаларына құйылады. Стерильді жағдайда пипетка көмегімен мұздатылған агарға 1,0 мл микроорганизмдердің тиісті суспензиясы Петри табақшаларына енгізіледі. Микроорганизмдерді агардың бүкіл бетіне біркелкі жайып еккеннен кейін, бөлме температурасында 15-20 минут инкубацияланады. Содан кейін микроорганизмдер егілген Петри табақшаларындағы агар бетіне диаметрі 6,0 мм жеті тесік жасалды. Содан кейін автоматты микропипетка көмегімен алты тесікке 20 мкл цианобактерия сығындылары енгізіледі. Сынамалар 37°C температурада 16 сағат бойы инкубацияланады. Нәтижелерді есепке алу саңылаудың айналасында бактериялардың өсуінің болуы немесе болмауы, саңылаудың айналасындағы өсудің тежелу аймақтарының диаметрін миллиметрмен өлшеу арқылы анынады.

Антибиотикалық ампициллин (10 мкг) дискілері сезімталдықты анықтау үшін оң этalon ретінде пайдаланылды. Тәжірибе үш реттік қайталымда жүргізілді.

Зерттелген дақылдардың бактерияға қарсы индексі келесі формула бойынша анықталды:

Бактерияға қарсы индекс = (сығындының өсуді тежеу аймағы/антибиотиктердің өсуді тежеу аймағы) × 100.

Нәтижелер және оларды талқылау

Алматы облысындағы Ақдала алабының егіс алқаптарының альгофлорасы

Ақдала алқабында күріш астындағы суару негізінен тұзданудың әртүрлі дәрежелері бар такыр тәрізді топырақтар игерілген. Бұл топырақтардың тұздануы бұрынғы гидроморфты топырақ түзілу кезеңдерінен мұраға қалған реликті сипатқа ие [15]. Алқап әкімшілік жағынан Алматы облысының Балқаш ауданына жатады. Ақдала суару алқабында климат құрт континенталды, құрғақ, тәуліктік және жылдық температуралың үлкен амплитудасы бар. Қысы суық, қар аз, жазы ыстық және құрғақ. Бақанас ауылындағы метеостанцияның мәліметі бойынша ауаның ең жоғары орташа айлық температурасы 24-26°C шілдеде, абсолюттік максимум 45°C, ең төменгі -14-16°C абсолютті қантарда байқалады, минимум -45°C. Орташа жылдық температура оң, шамамен 6,6-9,9°C. Аязсыз маусымның ұзақтығы 150-160 күн. Топырақтың қату тереңдігі әдетте 40-45 см-ден аспайды және қар аз жауатын қатты қыстаған 1 м-ге жетеді. Көпжылдық циклде жауын-шашынның мөлшері 100-ден 360 мм-ге дейін өзгереді, бірақ орташа есеппен 180-240 мм құрайды [16].

Зерттеу нәтижелері бойынша топырақ сынамаларынан микробалдырлар мен цианобактериялардың 48 түрі анықталды. Бес түрі сары-жасыл, 21 түрі цианобактериялар, 8 түрі диатомдар және 14 түрі жасыл балдырлар. Ең жиі кездесетін түрлерге ие топ 5 түрден тұрады: *Phormidium autumnale*, *Nitzschia palea*, *Chlorella vulgaris* және *Nostoc linckia*, *Anabaena flos-aguae*. Жасыл балдырлардың арасында *Chlorophyceae* (*Chlamydomonadaceae* және *Chlorococcaceae*) екі класының түрлері анықталды *Bacillariophyta* бөліміне

Bacillariaceae және *Diadesmidaceae* тұқымдасының өкілдері кірді. Сары-жасыл *Botrydiopsidaceae* және *Eustigmataceae* тұқымдасынан болды.

Анықталған цианобактериялардың ішінде, түрлердің әртүрлілігі бойынша *Nostocaceae* тұқымдасы жетекші орынға ие, оның ішінде 4 тұқымdas (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira* және *Nostoc*). Шыныға бекініп өсken цианобактериялар өкілдерінің негізгі улесі *Anabaena cylindrica*, *A. oscillarioides*, *Nostoc commune* сияқты гетероцисталы формалардан тұрады. *Cyanophyta* бөлімінің сирек кездескен түрлері *Plectonema*, *Synechococcus* тұқымдасы ерекшеленді. Жіп тәрізді гетероцисталы (75%) цианобактериялар бір жасушалы колониялық (14%) және жіп тәрізді гетероцисталы емес (11%) формаларда айқын ұstemдік көрсетті.

Цианобактериялардың альгологиялық және бактериологиялық таза дақылдарын бөліп алу

Таңдалған топырақ үлгілері негізінде жинақы дақылдар бөліп алу әдісінің көмегімен цианобактериялардың 5 альгологиялық таза дақылдары бөлініп алынды. Морфологиялық белгілерге сәйкес цианобактериялар негізінен жіп тәрізді немесе колониялар түзеді, тек S4 культурасы кокка тәрізді жасуша пішініне ие.

Келесі кезеңде алынған альгологиялық таза цианобактерия дақылдары ілеспелі бактериялардан тазартылды. Бактериологиялық талдау бойынша барлық дақылдарда ілеспелі микрофлора анықталды. Бөлінген цианобактериялардың ілеспе микрофлорасы негізінен грам-оң және грам-теріс бактериялардан, ашытқылардан және зең саңырауқұлақтарынан тұратыны анықталды. Оқшауланған дақылдарды ілеспелі микрофлорадан тазарту өте қыын уақытты қажет ететін процесс, өйткені цианобактериялар мен бактериялар арасында тығыз биоценотикалық байланыстар бар екені белгілі. Цианобактериялардың шырышты қабаттары микроорганизмдер үшін қорек көзі және тіршілік ортасы ретінде қызмет етеді. Мұндай тығыз байланыс мұндай қауымдастықтарды оқшауланған дақылдарға бөлудің қындықтарын анықтайды.

Цианобактерияларды бактериологиялық тазалау үшін әртүрлі антибиотиктер қолданылды. Антибиотиктерді тәмен концентрацияда қолданған кезде ілеспе микроорганизмдердің, ашытқылардың, зең саңырауқұлақтардың, грам-оң және грам-теріс бактериялардың өсуі әлі де байқалғаны анықталды. Ілеспе микрофлораның антибиотикке сезімталдығын талдау барысында кейбір бактериялардың кейбір антибиотиктерге, ал екіншісінің басқаларға сезімтал екендігі анықталды. Әрі қарай, ілеспелі микрофлора әр түрлі антибиотиктерге әр түрлі кері жауап бергендейктен тазарту үшін антибиотиктердің қоспалары таңдалды: әр түрлі концентрацияда грам-оң және грам-теріс бактерияларға қарсы кең спектрлі антибиотиктер және саңырауқұлаққа қарсы антибиотиктер. Саңырауқұлаққа қарсы антибиотик ретінде барлық нұсқаларда кең спектрлі фунгицидтік антибиотик нистатин таңдалды (кесте 1).

Кесте 1- Цианобактерияларды ілеспелі микрофлорадан бактериологиялық тазарту

Антибиотиктер қоспасы	Дақыл S-1		Дақыл S-2		Дақыл S -3		Дақыл S-4		Дақыл S-5	
	iМ	Ц	iМ	Ц	iМ	Ц	iМ	Ц	iМ	Ц
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Гентамицин+ пенициллин+ тетрациклин+ нистатин	+/-	-/-	-/-	+/+	-/-	--/-	-/-	+/+	+/+	+/+
Неомицин+ ампициллин+ хлорамфеникол+ нистатин	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-

Кесте 1 жалғасы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Канамицин+пеницилл ин+ ванкомицин+ нистатин	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Пенициллин+ гентамицин+ канамицин+ нистатин	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+

Ескерту: ім-ілеспе микрофлораның өсуі, Ц-цианобактерия, - өсүдің болмауы, + дақылдың өсуі.

Антибиотиктердің қоспасы көмегімен цианобактериялардың ілеспелі микроорганизмдерін жою әрекеті сыналған 5 цианобактериялық дақылдың төртеуінде сәтті болды. Антибиотиктердің қоспасын қолданғаннан кейін S-1 культурасы әлі де ілеспелі бактериялармен қатты зақымдалғаны анықталды. Антибиотиктердің концентрациясын арттыру ілеспелі бактерияларға да, цианобактериялар дақылына да бактерицидтік әсер етті.

Антибиотиктер қоспасымен өңдеу нәтижесінде бактериологиялық таза 4 цианобактерия дақылдары алынды. Цианобактериялардың өміршендігі екі әдіспен – микроскопиялық және дақылдық түрде тексерілді. Алынған цианобактериялардың 4 дақылы бактериологиялық таза деп танылды, өйткені культураларды бөлме температурасында 7 күн ұстағаннан кейін ілеспелі бактериялардың өсуі анықталмады.

Бактериологиялық таза цианобактериялардың морфологиясын зерттеу S-2 жасуша қабықшалары, жұқа, бозғылт көк-жасыл екенін көрсетті. трихомалар иілген, бір-бірімен өрілген, көлденең қалқалары бөлінбеген, ұштары жұқа емес және тұзу, ашық көк-жасыл, ені 0,6-0,8 мкм жіпшелі цианобактериялар. Қынаптары түссіз, бір-біріне жабысады. Жасушалары цилиндр тәрізді, ұзындығы енінен 2-8 есе ұлken, көлденең қалқаларда түйіршіксіз. Жіппердің қалындығы бірдей, тек ең ұшы өте аздал тарылышп, сәл бүгілген. Соңғы жасуша доғал конусты. Бөліну бір жазықтықта жүреді, бұл жасушалардың сызықтық орналасуына әкеледі. Түсі кек-жасыл, клеткалар түбіне ыдыс түбіне шөгіп қалмайды, тек ыдыс қабырғасында бекініп өседі. Қатты қоректік ортада нашар өседі, өсу дақылдаудың 8-10-шы тәулігі ғана бақылана бастайды. Заррука сұйық ортасында 22-30 °C аяу температурасында жақсы өседі (1-сурет). Морфологиялық белгілері бойынша - класс: *Oscillatoriophycideae*, қатар: *Oscillatoriales*, тұқымдас: *Phormidiaceae*, туыс: *Phormidium*, түр - *Phormidium SP S-2* ретінде анықталады.

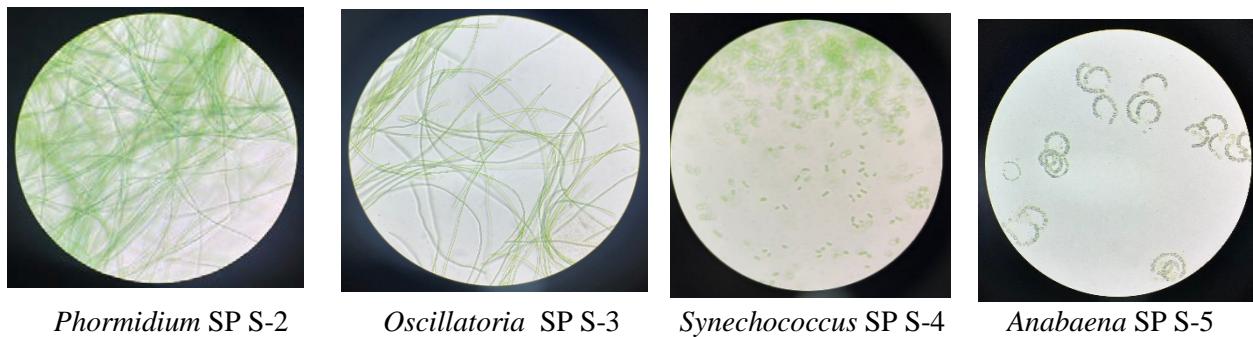
S3 дақылы - жіп тәрізді, айқын шырышты қабаты бар, трихомалар жалғыз, біртекті, қою көк-жасыл, жасуша өлшемдері 2,2 - 2,4-х 4,2-5,9 мкм. Трихомалар салыстырмалы түрде параллель орналасқан жіппердің құрайды. Трихомалар тұзу, көлденең бөлімдерде сәл иілген, ені 4-10 мкм, ашық көк-жасыл, кейде ұштарына сәл иілген болады. Жасушалардың ұзындығы 2,6-5 мкм, яғни енінен 2-3 есе қысқа. Көлденең бөлімдердегі түйіршіктеу көбінесе айқын көрінеді. Соңғы жасушалар азды-көпті айқын жарты шар тәрізді, кейде сәл қалындағы қабығы бар. Бөліну бір жазықтықта жүреді, бұл жасушалардың сызықтық орналасуына әкеледі. Түсі кек-жасыл, жасушалар өсіру ыдыстарының түбіне тұнбаланбайды, ыдыс қабырғасында бекініп өседі. Қатты ортада нашар өседі. Штамм автотрофты. Громов сұйық қоректік орталарында 22-30 °C аяу температурасында жақсы өседі (сурет 1). Морфологиялық сипаттамалары бойынша - класс: *Oscillatoriophycideae*, қатар : *Oscillatoriales*, тұқымдас: *Oscillatoriaceae*, туыс: *Oscillatoria*, түр: *Oscillatoria SP S-3* анықталды.

S-4 дақылы -олар сұйық ортада жақсы дамыды және қою жасыл түсті суспензия болды. Қатты қоректік орта бетінде дұрыс колониялар түзеді. Морфологиялық белгілерге сәйкес, овал пішінді жасушалар, кейде шеттері сәл қисық, ересек жасушалардың мөлшері 3,6-7,7 мкм құрайды. Жасушаның бөлініу дұрыс, бөлінгеннен кейін еншілес жасушалар кейде екі - төрт жасушадан тұратын тізбектерге қосылады. Зарруктың сұйық ортасында 22-35° С температурада жақсы өседі (сурет 1). Морфологиялық сипаттамалары бойынша -

класс: *Synechococcophycideae*, қатар: *Synechococcales*, тұқымдас: *Synechococcaceae*, туыс: *Synechococcus*, түр: *Synechococcus SP S-4*. Анықталды.

S-5 дақылы- қою көк-жасыл түсті жасушалар. Трихомалар ұштары тарылмаған. Трихомалар жалғыз, түзу, сфералық жасушалардан тұрады, олардың арасында гетероцисталар және сирек акинеттер кездеседі. Гетероцисталар көп жағдайда интеркалярлы болады. Трихомалардың диаметрі 2-8 мкм аралығында. Бөліну бір жазықтықта жүреді. Сұйық ортада шыны қабырғасына бекініп өседі. Штамм автотрофты. BG-11 сұйық және қатты орталарында 22-30⁰C аяу температурасында жақсы өседі (сурет 1). Морфологиялық сипаттамалары бойынша - класс: *Nostocophycideae*, қатар: *Nostocales*, тұқымдасы: *Nostocaceae*, туыс: *Anabaena*, түр: *Anabaena SP S-5* ретінде анықталды.

Зерттеу нәтижелері бойынша зерттелген топырақ үлгілерінен 5 альгологиялық таза цианобактерия дақылдары бөлініп алынған, антибиотиктермен өңдеуден кейін бактериологиялық және альгологиялық таза дақылдар ретінде 4 дақыл бөлініп алынды.



Сурет 1 - Цианобактериялардың бөлініп алынған альгологиялық және бактериологиялық таза дақылдары

Цианобактериялардың оқшауланған дақылдарының бактерияга қарсы белсенділігі

Цианобактериялар – әртүрлі биоактивті молекулалардың өндірушілері болып саналады және ол бұл организмдерге эволюциялық артықшылықтарды қамтамасыз етеді. Сигналдық метаболиттердің функцияларын орындайтын, сондай-ақ басқа организмдердің өсуі мен дамуына әсер ететін цианобактериялармен синтезделген аллелохимиялық сипаттағы заттар бактерияларға қарсы, зең саңырауқұлақтарына және вирустарға қарсы әсері әсер етуі мүмкін [17,18].

Ақала күріш алқаптарынан бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының бактерияға қарсы белсенділігін зерттеу үшін цианобактериялар биомассасы алынды. Цианобактерия дақылдарының биомассасынан әр түрлі еріткіштер көмегімен сығындылар алынды. Ампициллин антибиотигі оң бақылау ретінде пайдаланылды. Зерттеу нәтижесінде өсу аймағының тежелу диаметрі цианобактериялардың түріне, қолданылған еріткіш түріне және сыналған микроорганизмдердің түріне байланысты болатыны анықталды.

Зерттелген дақылдардың ішінде *Oscillatoria SP S-3* және *Anabaena SP S-5* дақылының метанол сығындылары бактерияға қарсы жоғары белсенділікті көрсетті. Зерттеу нәтижелері бойынша *Oscillatoria SP S-3* культурасының метанол сығындысының бактерияға қарсы әсерін зерттеу кезінде тежелу аймағының диаметрі *E. Coli* -12 ±0,02 мм, *Staphylococcus aureus* -11±0,01 мм. *P. aeruginosa* және *B. subtilis* бактерияларында өсудің тежелу аймағы небәрі 9,2 =0,03 және 9,3=0,01 мм болды (кесте 2).

Зерттеудегі ең жоғары бактерияға қарсы белсенділік *Anabaena SP S-5* культурасының метанол сығындысының әсері *B. subtilis* - 12 ±0,05 мм және *E. coli* -10,8±0,01 мм, содан кейін *Staphylococcus aureus* - 9,2±0,05 мм және *P. aeruginosa* -8,5±0,06 мм (2-кесте) бақыланды.

Oscillatoria SP S3 дақылы, зерттелген микроорганизмдердің тест штамдарына орташа бактерияға қарсы белсенділікті көрсетті (кесте 2).

Бактериялардың зерттелген тест штамдары *Synechococcus SP S-4* дақылының метанол сығындысына тәжелудің ең аз аймағын көрсетті. Өсүдің тәжелу аймағы 0,9-2,5 мм аралығында болды.

Кесте 2 - Бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының әртүрлі сығындыларына тест микроорганизмдердің сезімталдығы (өсүдің тәжелу аймағы, мм).

Цианобактерия дақылдары	Микроорганизмдердің тест дақылдары	Оқшауланған цианобактерия дақылдарының экстракти	
		Метанол	Этанол
<i>Phormidium</i> SP S-2	<i>P. aeruginosa</i>	5,5±0,06	1,3±0,02
	<i>B. subtilis</i>	4,3±0,01	0,8±0,06
	<i>E. coli</i>	3,2±0,04	1,0±0,04
	<i>St. aureus</i>	3,5±0,02	1,2±0,02
<i>Oscillatoria</i> SP S-3	<i>P. aeruginosa</i>	9,2±0,03	5,6±0,04
	<i>B. subtilis</i>	9,3±0,01	4,3±0,05
	<i>E. coli</i>	12 ±0,02	6,6±0,04
	<i>St. aureus</i>	11±0,01	5,3±0,01
<i>Synechococcus</i> SP S-4	<i>P. aeruginosa</i>	2,5±0,01	0,5±0,02
	<i>B. subtilis</i>	1,3±0,03	0,2±0,01
	<i>E. coli</i>	1,2±0,01	0,3±0,02
	<i>St. aureus</i>	0,9±0,02	0,1±0,02
<i>Anabaena</i> SP S-5	<i>P. aeruginosa</i>	8,5±0,06	10,2±0,03
	<i>B. subtilis</i>	12 ±0,05	5,2±0,04
	<i>E. coli</i>	10,8±0,01	5,5±0,01
	<i>St. aureus</i>	9,2±0,05	4,6±0,02

Этанол сығындысы жағдайында бактерияға қарсы белсенділікті *Oscillatoria sp S3* және *Anabaena SP S5* дақылдары да көрсетті, бірақ метанол сығындысымен салыстырғанда онша айқын емес. *Oscillatoria SP S-3* қультурасының этанол сығындысын пайдаланған кезде өсүдің тәжелу аймағы *E. coli* - 6,6±0,04 мм құрады, ал аталған дақылдың метанол сығындысында өсүдің тәжелу диаметрі 12 ±0,02 мм көрсетті. Бірақ өсүдің белсенді тәжелуі *P. aeruginosa* бактериясында *Anabaena SP S5* дақылының этанол сығындысын зерттеу кезінде байқалды және тәжелу аймағы 10,2±0,03 мм болды, ал осы дақылдың метанол сығындысында тест дақылдың өсуінің тәжелу аймағы 8,5±0,06 мм болды (кесте 2).

Оң бақылауда (ампициллин) зерттелген тест микроорганизмдердің өсуінің тәжелу аймақтары айқын көрінді, және тәжелу диаметрі 18-ден 20 мм аралығында болды.

Бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының сығындыларының бактерияға қарсы әсері коммерциялық ампициллин антибиотиктерімен салыстырылды және бұл салыстырудың нәтижелері бактерияға қарсы индекс ретінде (кесте 3) келтірілген. Индекс деректеріне сәйкес, *Oscillatoria SP S-3* және *Anabaena SP S-5* дақылынан алынған метанол сығындыларының тиімділігі, әсіресе *E. coli*-ге қатысты, 66,6% және 60% ампициллин антибиотигінің тиімділігіне жақын. Сондай-ақ *Oscillatoria SP S-3* қультурасы *St aureus* - 55% бактериясына қарсы оң белсенділік көрсетті. *Anabaena SP S5* дақылы тест дақылдардың өсуін тәжеуге қатысты айтарлықтай белсенділік көрсетті және бактерияға қарсы индекс метанол сығындысымен *E.coli* -60% және этанол сығындысымен *P. aeruginosa* -51% құрады.

Кесте 3 - Бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының сығындыларының бактерияға қарсы индексі %.

Цианобактерия дақылдары	Микроорганизмдердің тест дақылдары	Оқшаланған цианобактерия дақылдарының экстракти	
		Метанол	Этанол
<i>Phormidium</i> SP S-2	<i>P. aeruginosa</i>	27,5	6,5
	<i>B. subtilis</i>	22,6	4,2
	<i>E. coli</i>	17,7	5,5
	<i>St. aureus</i>	17,5	6
<i>Oscillatoria</i> SP S-3	<i>P. aeruginosa</i>	46	28
	<i>B. subtilis</i>	48,9	22,6
	<i>E. coli</i>	66,6	36,6
	<i>St. aureus</i>	55	26,5
<i>Synechococcus</i> SP S-4	<i>P. aeruginosa</i>	12,5	2,5
	<i>B. subtilis</i>	6,8	1,0
	<i>E. coli</i>	6,6	1,6
	<i>St. aureus</i>	4,5	0,5
<i>Anabaena</i> SP S-5	<i>P. aeruginosa</i>	42,5	51
	<i>B. subtilis</i>	63,1	27,3
	<i>E. coli</i>	60	30,5
	<i>St. aureus</i>	46	23

Зерттеу нәтижелері бойынша цианобактериялардың барлық бөлініп алынған дақылдарының ішінде *Oscillatoria* SP S-3, *Anabaena* SP S-5 дақылдары тест штамдарының өсуінің тежелуінің ең үлкен аймақтарын көрсетіп, максимальды бактерияға қарсы белсенділікті көрсеткенін атап өтуге болады. *Phormidium* SP S-2, *Synechococcus* SP S-4 дақылдарында зерттелген тест дақылдар қатынасында төменгі бактерияға қарсы белсенділік бақыланды. Кең спектрлі антибиотик ампициллин барлық тест бактериялардың өсуін тежеп, айқын өсу зонасының тежелуі анықталды.

Қорытынды

Цианобактериялар жаңа препараторды әзірлеу үшін ықтимал бактерияларға қарсы белсенділігі бар табиғи өнімдердің ең перспективалы, бірақ пайдаланылмаған көздерінің бірі болып саналады. Оңтайлы жарық, су, температура, ылғалдылық және қоректік заттардың қол жетімділігі бар күріш алқаптарының экожүйелері цианобактериялардың жаппай өсуі үшін қолайлы ортаны қамтамасыз етеді. Зерттеу нәтижелері бойынша Ақдала массивінің егіс алқаптарының топырағынан микробалдырылар мен цианобактериялардың 48 түрі, оның ішінде 21 түрі - цианобактериялар анықталды. Цианобактериялар өкілдерінің негізгі үлесі гетероцисталы формалар болды. Жіп тәрізді гетероцисталы формалардың басқа формаларға (бір жасушалы және жіп тәрізді гетероцисталы емес) үстемдігі күріш алқаптарының басқа топырақтарында да тіркелді [19]. Цианобактериялар табиғатта кең таралғанымен, гетероцисталы популяциясының көпшілігі батпақты күріш алқаптарында өсетіні әдеби мәліметтерде көтірілген, өйткені күріш алқаптары азотты бекітетін цианобактериялардың мол өсуіне өте қолайлы орта болып саналады [20].

Анықталған цианобактериялардан 5 альгологиялық таза цианобактерия дақылдары бөлініп алынды, бірақ оның тек төрт дақылы бактериологиялық таза дақыл ретінде бөлініп алынды.

Соңғы онжылдықтарда скринингтік бағдарламалар цианобактериялардың медицина мен фармация үшін жаңа белсенді заттардың әлеуетті көзі екенін көрсетті және көптеген белсенді қосылыстар бөлініп алынды [21]. Эволюция процесінде цианобактериялар басқа организмдердің өліміне әкелетін заттарды детоксикациялаудың әртүрлі механизмдерін жасады [22]. Топырақ цианобактерияларының бәсекеге қабілеттілігі, атап айтқанда,

олардың басқа микроорганизмдердің көбеюін тежейтін биологиялық белсенді заттардың синтезі сияқты қабілетіне негізделген.

Зерттеу нәтижелері бойынша бактериологиялық таза дақыл ретінде бөлініп алынған цианобактериялардың арасынан *Oscillatoria SP S-3*, *Anabaena SP S-5* дақылдарының метанол ерітіндісінде *E. coli* және *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* өсүнің тежелуінің ең үлкен аудандарын көрсетете отырып максималды бактерияға қарсы белсенділікті көрсетті. Бұл нәтижелер Osman R. K. et al мәліметтеріне сәйкес келеді (2015), цианобактериялардың 14 түрін селективті іріктеу нәтижелері бойынша *Fisherella sp.*, *Oscillatoria sp.* және *Anabaena sp.* дақылдары грамтеріс бактериялар *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimuri* грам-оң бактериялар *S. aureus*, *B. cereus* қарсы антагонистік белсенділікке ие болды [23].

Әртүрлі еріткіштерді қолдану арқылы алынған цианобактериялардың әртүрлі түрлерінің сығындылары патогендер қатынасында бактерияларға қарсы белсенділіктің әртүрлі дәрежесі көптеген әдеби мәліметтерде көлтірілген. Tiwari & Sharma зерттеулерінде *Anabaena variabilis* және *Synechococcus* цианобактериялық сығындылары *Enterococcus sp.*, *Klebsiella sp.* және *E. coli* қарсы айтарлықтай бактерияға қарсы белсенділікті көрсетті [24]. Басқа авторлар *B. subtilis* және *P. aeruginosa*-ға қарсы хлороформ мен метанолдан алынған *Anabaena variabilis* дақылының сығындылары айтарлықтай бактерияға қарсы белсенділігін байқады [25].

Бактерияларға қарсы агенттер ретінде цианобактериялардан хлореллин туындылары, акрил қышқылы, алифатты қосылыстар, терпендер, күкірт бар гетерофильді қосылыстар, фенол ингибиторлары және т. б. сияқты көптеген заттар анықталды [26].

Олар әртүрлі биотехнологиялық маңызды қосылыстардың көп мөлшерін алу үшін орасан зор, бірақ әлі де аз пайдаланылған ресурс болып табылады, өйткені олар әртүрлі әсер ететін биологиялық белсенді заттарды синтездейді, соның ішінде саңырауқұлаққа қарсы, бактерияға қарсы және вирусқа қарсы белсенділік. Ал цианобактериялардың жаңа түрлерін іздестіру және оқшаулау және биологиялық белсенді заттардың продукттерін дұрыс тандау ауыл шаруашылығы биотехнологиясында үлкен мүмкіндіктер мен перспективалар ашады. Табиғи текстес қосылыстар синтетикалық қосылыстармен салыстырғанда онай биологиялық ыдырайды және қоршаған ортаға қауіпсіз қосылыстар болып саналады [27].

Қаржыландыру

Бұл жұмыс ИРН AP14870201 «Ауыл шаруашылығы биотехнологиясында пайдалану үшін цианобактериялардың болашағы мол жаңа екінші реттік метаболиттерін іздеу және зерттеу», AP13068051 «Ауыл шаруашылығы өсімдіктерінің өнімділігін арттыру үшін микробалдырлар мен цианобактериялар штамдары негізінде биопрепараттар алу технологиясын әзірлеу» есебінен орындалды.

Әдебиеттер:

- 1 Abed R.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106: 1–12.
- 2 Prasanna R., Sood A., Ratha S.K., Singh P.K., Naveen K. Sharma, Ashwani K. Rai and Lucas J. Sta (eds.). *Cyanobacteria as a “green” option for sustainable agriculture. Cyanobacteria: an economic perspective*, 2014, 9: 145-166.
- 3 Thajuddin, N., Subramanian, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 2005, 89 (1): 47-57.
- 4 Kreitlow, S., Mundt, S. & Lindequist, U. Cyanobacteria - a potential source of new biologically active substances. *Progress in Industrial Microbiology*, 1999, 35: 61-63.
- 5 Taskin E., Ozturk M., Taskin, E. & Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(24): 2746-2751.

6 Kim J.D. Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from Rice Paddy Soil for Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology*, 2006, 34(3):138-42 (doi: 10.4489/MYCO.2006.34.3.138).

7 Derikvand P., Llewellyn C.A., Purton S. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: A comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, 2017, 52:43-56. (doi: 10.1080/09670262.2016.1214882).

8 Mallavarapu, M. Healthy levels of soil algae lift plant growth, CISRO land and water farming ahead, 2001, 120:21.

9 Bowman J.P., Rea S.M., McCammon S.A. et al. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Environmental Microbiology*, 2000, 2: 227-237.

10 Голлербах М. М., Полянский В. Н. *Пресноводные водоросли их изучение*. Изд-во «Сов. наука», 2001. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. Синезеленые водоросли. М.: Изд-во «Сов. наука», 1953.

11 А. М. Музаров, А. Э. Эргашев, С. Халилов. *Определитель синезеленых водорослей Средней Азии*, АН УзССР, Ин-т ботаники, Ташкент, 1987.

12 Temraleeva A.D., Dronova S.A., Moskalenko S. V., Didovich S.V. Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. *Microbiology*, 2016, 85: 389–399.

13 Malathi, T., Ramesh Babu, M., Mounika, T., Snehalatha, D. & Digamber Rao Screening of cyanobacterial strains for antibacterial activity. *Phykos: Journal of the Phycological Society*, 2014, 44(2): 6-11.

14 Perez, C., Pauli, M. & Bazerque, P. An antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biologiae et Medecine Experimentalis*, 1990, 15: 113-115.

15 Poshanov M.N., Otarov A., Duisekov S.N., Elantseva N.V., Smanov Z.M., Suleimenova A.I. Calculation of water flow in using various methods of rice irrigation (drip irrigation and pressing). *Soil Science and Agrichemistry*, 2018, 4: 40-47.

16 Кулагин В.В., Шакибаев И.И., Муртазин Е.Ж. *Методические указания по проведению мониторинга орошаемых земель Республики Казахстан*. Астана, 1998.

17 Кокшарова О.А. Применение методов молекулярной генетики и микробиологии в экологии и биотехнологии цианобактерий. *Микробиология*, 2010, 79(6): 734-747.

18 Singh R., Parihar P., Singh M., Bajguz A., Kumar J., Singh S., Singh V. P., Prasad S. M. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontiers Microbiology*, 2017, 8: 515.

19 Abinandan S., Subashchandrabose SR., Venkateswarlu K., Megharaj M. Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(8): 981–998.

20 Bharadwaj N., Baruah P.P. Diversity and abundance of N₂-fixing cyanobacterial population in rice field soil crusts of Lower Brahmaputra Valley agro-climatic zone. *Journal Algal Biomass Utilization*, 4:23–33.

21 Chunleuchanon S., Sooksawang A., Teaumroong N., Boonkerd N. Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: population dynamics as affected by environmental factors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 19(2): 167–173.

22 Kumar B.N.P., Manabobi S., Satyam S. Cyanobacteria: a potential natural source for drug discovery and bioremediation. *Journal of Industrial Pollution Control*, 2016, 32 (2): 508–517.

23 Osman R.K., Goda H.A., Higazy A.M. Evaluation of some extra- and intracellular cyanobacterial extracts as antimicrobial agents. *International Journal of Advanced Research*, 2015, 5: 852–864.

24 Tiwari, A. & Sharma, D. Antibacterial activity of bloom farming Cyanobacteria against clinically isolated human pathogenic microbes. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2013, 4 (1): 83-89.

25 Malathi, T., Ramesh Babu, M., Mounika, T., Snehalatha, D. & Digamber Rao, Screening of cyanobacterial strains for antibacterial activity. *Phykos: Journal of the Phycological Society*, 2014, 44(2): 6-11.

26 Lavanya R., Veerappan V. Antibacterial potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of southeast coast of India. *Advances in Biological Research*, 2011, 5(1): 38-44.

27 Oz Demir G., Karabay N.U., Dalay M.C., Pazarbasi B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother Res*, 2004, 18: 754-757.

С.Н. СЕЙЛБЕК, М. ТОРТАЙ, Н.Р. АКМУХАНОВА*, Ф.К. САРСЕКЕЕВА,
Д.К. КИРБАЕВА, Н.Е. БИДАҒҰЛОВА, Н.А. АЛТЫБАЕВА, А.Б. ЕЛАМАНОВА
Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан
*e-mail: akmukhanova.nurziya@gmail.com

БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПОСЕВНЫХ ПЛОЩАДЕЙ АКДАЛИНСКОГО МАССИВА И ВЫДЕЛЕНИЕ ЦИАНОБАКТЕРИИ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Аннотация

Изучено видовое разнообразие цианобактерий и микроводорослей посевных площадей Акдалинского массива Алматинской области. Биоразнообразие микроорганизмов представляет собой крупнейший неиспользованный резервуар для потенциального открытия новых перспективных видов микроорганизмов. Целью исследований было изучение видового разнообразия микроводорослей и цианобактерий и выделение перспективных видов цианобактерий. По результатам исследований из почв посевных площадей Акдалинского массива были выделены 48 видов микроводорослей и цианобактерий, из них 21 вид - цианобактерии. Основную долю представителей цианобактерий составляли гетероцистные формы. Из определенных видов цианобактерий выделено 5 альгологически чистых культур, но при получении бактериологически чистых культур после обработки с антибиотиками 4 культуры цианобактерий получены в чистом виде. По результатам исследований из выделенных четырех видов цианобактерий максимальную антибактериальную активность проявляли культуры *Oscillatoria SP S-3*, *Anabaena SP S-5*, показывая наибольшие площади угнетения роста тест-культур *E. coli* и *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* с экстрактами метанола. Цианобактерии представляют собой огромный, но еще малоиспользуемый, ресурс для получения большого количества различных биотехнологически важных соединений, обладающих антрафунгальной, антибактериальной и антивирусной активностью. Поиск и выделение новых видов цианобактерий и правильный выбор продуцентов биологически активных веществ открывает большие возможности и перспективы в агробиотехнологии.

Ключевые слова: биоразнообразие, микроводоросли, цианобактерии, альгологически чистые культуры, антибактериальная активность.

IRSTI: 62.99.39

S.N. SEILBEK, M. TORTAY, N.R. AKMUKHANOVA*, F.K. SARSEKEEVA,
D.K. KIRBAEVA, N.E. BIDAGULOVA, N.A. ALTYBAEVA,
A.B. ELAMANOVA

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: akmukhanova.nurziya@gmail.com

BIODIVERSITY OF MICROALGAE OF ACREAGE OF THE AKDALA VALLEY AND ISOLATION OF CYANOBACTERIA WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.14

Abstract

The species diversity of cyanobacteria and microalgae of the acreage of the Akdala valley in the Almaty region has been studied. Microbial biodiversity represents the largest untapped reservoir for the potential discovery of new promising species of microorganisms. The aim of the research was to study the species diversity of microalgae and cyanobacteria and identify promising species of cyanobacteria. According to the results of the research, 48 species of microalgae and cyanobacteria were identified from the soils of the acreage of the Akdala valley, where 21 species were cyanobacteria. The main proportion of representatives of cyanobacteria were heterocystic forms. 5 algological pure cyanobacteria cultures were isolated from certain types of cyanobacteria, but when obtaining bacteriologically pure cultures after treatment with antibiotics, 4 cyanobacteria cultures were obtained in pure form. According to the results of the research, the cultures of *Oscillatoria* SP S-3, *Anabaena* SP S-5 showed the maximum antibacterial activity from the isolated four species of cyanobacteria, also showing the largest areas of growth inhibition of the test strains of *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* with methanol extracts. Cyanobacteria are a huge, but still small-used resource for obtaining a large number of various biotechnologically important compounds, because they synthesize various biologically active substances, which have antifungal, antibacterial, anti-virus activity. The search and isolation of new species of cyanobacteria and the right choice of producers of biologically active substances opens up great opportunities and prospects in agrobiotechnology.

Keywords: biodiversity, microalgae, cyanobacteria, algologically pure cultures, antibacterial activity.

The emergence of soil organic matter occurs with the direct participation of microorganisms, whose multilateral action on plant and animal residues is described by a variety of biochemical reactions. Filling the spaces unoccupied by higher plants, Cyanobacteria serve as a factor of additional assimilation of solar energy and a source of additional biomass [1]. They participate in the formation of soils and affect the physicochemical properties of the formed soils. The functions of cyanobacteria in soils are determined by the ability to produce organic matter, fix atmospheric nitrogen, increase the availability of phosphorus and other elements, release phytohormones and toxins and also provide anti-erosion activity due to mucous substances and filamentous thallomas [2]. The components producing cyanobacteria are antioxidants and pigments (including fucoxanthin, carotenoids, lutein, b-carotene, astaxanthin and phycobiliproteins), long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and proteins (essential amino acids methionine, threonine and tryptophan). These secondary metabolites are widely used in the food, feed, agricultural and pharmaceutical industries [3].

It is also known that various types of cyanobacteria produce intracellular and extracellular metabolites with antibacterial and antifungal properties [4]. Antimicrobials are widely used in the treatment of bacterial infections, but bacteria can become resistant to existing drugs. For this reason, researchers began searching for natural compounds to discover new antibacterial compounds [5]. Cyanobacteria are considered as promising biological resources in this area.

Cyanobacteria are the main component of the microbial community in rice fields, contribute

to the fertility of agricultural ecosystems and potential source of biologically active secondary metabolites, which are compounds that are not necessary for cellular metabolism [6]. Some potential applications of cyanobacteria that should be considered are the production of antibacterial compounds for the pharmaceutical industry and the agricultural sector as biofertilizers and biocontrol agents. Isolation and screening of cyanobacteria for the presence of antibacterial substances and other pharmacologically active compounds is of increasing interest as a potential source of new agrochemical agents [7]. In this regard, the purpose of our research work is to study the species diversity of cyanobacteria and microalgae of the acreage of the Akdala valley in the Almaty region and identify promising species of cyanobacteria.

Materials and methods

The object of research is the rice systems of the Akdala rice-growing valley, located on the delta of the Ile River.

Soil sampling was carried out using the envelope method [8]. A total of 28 algological samples were collected. All collected samples were carefully labelled. The labels indicated the sample number, the time and place of collection and the name of the collector. In the course of the study, field collections and laboratory analyses were carried out using methods generally accepted in algological practice. The qualitative composition of cyanobacteria was analyzed by the fouling glass method. To do this, the soil samples were placed in Petri dishes, soaked with BG-11 medium and cover glasses were placed on the surface so that they were in full contact with the soil.

The cups were incubated in natural light and at room temperature, and after 30 days the glasses were examined for the presence of fouling. Cyanobacteria and microalgae were researched using «Premere» and «MicrosAustria» light microscopes with magnification from 40 to 100 times. About 30-40 visual fields were viewed from each water sample on at least 5 preparations. The results obtained were shown as the number of cells in 1 ml of water. The number of cyanobacteria and microalgae was estimated on a frequency scale when recalculated by 100 visual fields [9]. The types of cyanobacteria and microalgae were determined in the native and fixed preparations of cells. At the same time, formaldehyde and iodine solutions were used as a fixative. The types of cyanobacteria and microalgae were determined using determinants [10, 11].

The accumulation culture of cyanobacteria was obtained according to the traditional method, standard microbiological methods were used to isolate an algologically pure culture from the accumulation cultures [12]. Cyanobacteria were grown in 500 ml flasks under sterile conditions. The mineral medium of Gromov, Zarruk, IP-11 were used.

To obtain extracts of cyanobacteria, dry biomass of isolated cultures was obtained. Dried samples were crushed using a sterile mortar and pestle. Then 0.5 g of the crushed sample was mixed with 10 ml of the solvents used (methanol, ethanol) and kept overnight at room temperature in a rotating shaker for complete extraction. At 4000 rpm for 15 minutes, the extracts were centrifuged and concentrated at 50°C at reduced pressure. The concentration was adjusted to 1 mg/ml using the same solvent used for extraction and analyzed for antibacterial activity [13].

The antibacterial activity of isolated cyanobacteria cultures was studied on four types of microorganisms from the culture collection of the Biotechnology faculty of Al-Farabi Kazakh National University: gram-negative cocci facultative anaerobes *Escherichia coli* and aerobic *Pseudomonas aeruginosa*, aerobic gram-positive spore-forming cocci *Bacillus subtilis* and facultative anaerobic gram-positive cocci *Staphylococcus aureus*. Antibacterial activity was determined using the agar diffusion method [14]. For the study, pure cultures of microorganisms pre-grown on meat-peptone agar (MPA) at a temperature of 37°C for 24 hours were used. The standard bacterial suspension was prepared on a sterile 0.9% sodium chloride solution. To do this, the culture was introduced into a sterile vial with sterile saline with a bacteriological loop and the concentration of microorganisms was brought to a value of 0.5 units of the McFarland turbidity standard. Melted and cooled until 56°C MPA was poured into Petri dishes. 1.0 ml of the corresponding suspension of microorganisms was added to the frozen agar using an automatic pipette under sterile conditions in Petri dishes. After the uniform distribution of microorganisms

over the entire surface of the agar, the cups were incubated at room temperature for 15-20 minutes. Then seven holes with a diameter of 6.0 mm were made on a cup with microorganisms. Then, with the help of an automatic micropipette, cyanobacteria extracts were introduced into six wells by 20 μl . The samples were incubated at a temperature of 37 °C for 16 hours. The results were taken into account by the presence or absence of bacterial growth around the wells with extraction by measuring the diameter of the zone around the well in millimeters.

Discs with the antibiotic ampicillin (10 micrograms) were used as a positive reference standard for determining sensitivity. The experiment was carried out in a triple repetition.

The antibacterial index of the researched cultures was determined by the formula:

$$\text{Antibacterial index} = (\text{extract inhibition zone}/\text{antibiotic inhibition zone}) \times 100.$$

Results and discussion

Algoflora of acreage of the Akdala valley in the Almaty region

In the Akdala Valley, irrigation under rice is mainly developed takyr-like soils with different degrees of salinization. The salinization of these soils has a relict character, inherited from earlier hydromorphic soil formation periods [15]. The valley administratively belongs to the Balkhash district of the Almaty region. On the Akdala irrigation valley, the climate is sharply continental, arid with a large amplitude of daily and annual temperatures. Winter is cold, with little snow, summer is hot and dry. According to the meteorological station in the village of Bakanas, the highest monthly average air temperature values 24-26°C are observed in July, with an absolute maximum of 45°C, the lowest minus 14-16°C in January, with an absolute minimum of minus 45°C. The average annual temperature is positive, about 6.6-9.9°C. The duration of the frost-free season is 150-160 days. The depth of freezing of the soil usually does not exceed 40-45 cm and only in severe winters with little snow reaches 1 m. The amount of precipitation in the long-term cycle varies from 100 to 360 mm, but on average is 180-240 mm [16].

According to the results of the research, 48 species of microalgae and cyanobacteria were identified from selected soil samples. Five species are yellow-green, 21 species are cyanobacteria, 8 species are diatoms and 14 species are green. The group that has the most common species is represented by 5 species: *Phormidium autumnale*, *Nitzschia palea*, *Chlorella vulgaris* and *Nostoc linckia*, *Anabaena flos-aguae*. Two classes of *Chlorophyll species* (*Chlamydomonadaceae* and *Chlorococcaceae*) have been identified among green algae. The *Bacillariophyta* division included representatives of the *Bacillariaceae* and *Diadesmidaceae* families. From the yellow-green family *Botrydiopsidae* and *Eustigmataceae*.

Of the certain species of cyanobacteria, the leading position in species diversity is occupied by the family *Nostocaceae*, headed by 4 genera (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira* and *Nostoc*). The main part of representatives of cyanobacteria that grew up attached to glass is *Anabaena cylindrica*, *A. oscillarioides*, *Nostoc commune*, composed of heterocystic forms. The genera *Plectonema*, *Synechococcus* differ in a smaller number of the *Cyanophyta* species. *Filamentous heterocystic* (75%) cyanobacteria demonstrated clear dominance over unicellular colonial (14%) and filamentous non-heterocystic (11%) forms.

Isolation of algologically and bacteriologically pure Cyanobacteria cultures

Using the method of accumulative cultures based on selected soil samples, 5 algologically pure cyanobacteria cultures were isolated. According to morphological features, cyanobacteria are mostly filamentous or form colonies, only the S-4 culture has a coccoid cell shape.

At the next stage, the obtained algologically pure cyanobacteria cultures were purified from satellite bacteria. According to the estimates of bacteriological analysis, concomitant microflora was present in all cultures. It was revealed that the accompanying microflora of isolated cyanobacteria mainly consists of gram-positive and gram-negative bacteria, yeast and mold. The purification of isolated cultures from bacteria is a very complex and time-consuming process, since it is known that there are dense biocenotic connections between cyanobacteria and bacteria. The mucous membranes of cyanobacteria serve as a source of nutrition and shelters for

microorganisms. This close relationship determines the difficulties of dividing such communities into isolated cultures: cyanobacteria and bacteria.

Different antibiotics were used for bacteriological purification of cyanobacteria. It was determined that when using antibiotics in lower concentrations, the growth of associated microorganisms, yeast, mold, gram-positive and gram-negative bacteria was still observed. During the analysis of the antibiotic sensitivity of the associated microflora, it was found that some bacteria are sensitive to some antibiotics, and the latter to others. Further, mixtures of antibiotics were selected for purification: broad-spectrum antibiotics, against gram-positive and gram-negative bacteria, and antifungal antibiotics in various concentrations, since the accompanying microflora reacted differently to different antibiotics. A broad-spectrum fungicidal antibiotic nystatin was selected as an antifungal antibiotic in all variants (Table 1).

Table 1 - Bacteriological purification of cyanobacteria from accompanying microflora

A mixture of antibiotics	Culture S-1		Culture S-2		Culture S-3		Culture S-4		Culture S-5	
	cm	C								
Gentamicin+ penicillin+ tetracycline+nystatin	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Neomycin+ ampicillin +chloramphenicol+ nystatin	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Kanamycin+ penicillin+ lincomycin+ nystatin	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Penicillin+ gentamicin+ kanamycin+ nystatin	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+

Note: cm - concomitant microflora, C-cyanobacteria, - lack of growth, + culture growth.

These attempts to eliminate the accompanying microflora of cyanobacteria using a mixture of antibiotics were successful for 4 out of 5 tested cyanobacteria cultures. It was found that after using a mixture of antibiotics, the S-1 culture was still heavily infected with satellite bacteria. An increase in the concentration of antibiotics had a bactericidal effect on both satellite bacteria and cyanobacteria culture.

As a result of treatment with a mixture of antibiotics, 4 cultures of cyanobacteria were obtained bacteriologically pure. The viability of cyanobacteria was tested in two ways - microscopically and culturally. The 4 cyanobacteria cultures obtained were recognized as bacteriologically pure, since the growth of "dormant" satellite bacteria after holding the cultures at room temperature for 7 days was not detected.

The study of the morphology of bacteriologically pure cyanobacteria showed that the culture of S-2 turf is leathery, thin, pale blue-green, trichomes are curved, intertwined, laced at the transverse partitions, not thin and straight at the ends, bright blue-green, 0.6-0.8 microns wide. The vaginas are colorless, glued together. The cells are cylindrical, their length is 2-8 times greater than the width, at the transverse partitions without granulations. The threads are the same thickness throughout, only the very end of it is very slightly narrowed and slightly bent. The terminal cell is obtusely conical. Division occurs in one plane, which leads to a linear arrangement of cells. The color is blue-green, the cells do not settle to the bottom, growing only by forming fouling on the vessel wall. It grows poorly on a solid medium, growth appears only on 8-10 days of cultivation. It grows well at an air temperature of 22-30°C on the liquid medium of Zarruk (Fig.1). According to morphological characteristics, it is identified as - class: *Oscillatoriophycideae* Order: *Oscillatoriales*, Family: *Phormidiaceae*, a genus of *Phormidium*, species *Phormidium* SP S-2.

Culture S-3 is filamentous, with a well-defined mucous membrane, single-row trichomes, dark blue-green, cell sizes 2.2- 2.4-x 4,2-5.9 microns. Trichomes form strands that are located relatively parallel. The trichomes are straight, slightly laced at the transverse partitions, 4-10 microns wide, bright blue-green, sometimes slightly curved towards the ends. The length of the

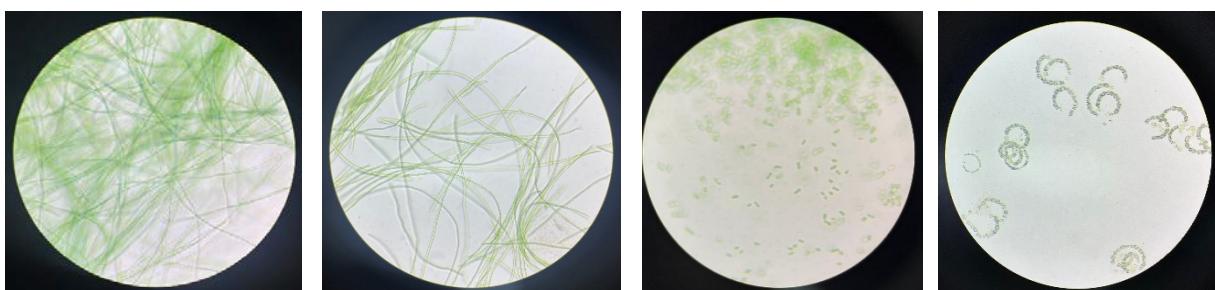
cells is 2.6-5 microns, i.e. 2-3 times shorter than the width. Granulation at the transverse partitions is mostly clearly noticeable. The terminal cells are more or less clearly hemispherical, sometimes with a slightly thickened shell. Division occurs in one plane, which leads to a linear arrangement of cells. The color is blue-green, the cells do not settle to the bottom, growing only by forming fouling on the vessel wall. It grows poorly on a solid medium, growth appears only on 8-10 days of cultivation. The strain is autotrophic. It grows well at an air temperature of 22-30°C on liquid and agarized Gromov medium (Fig.1).

According to morphological characteristics, it is identified as a - Class: *Oscillatoriophycideae* Order: *Oscillatoriales*, Family: *Oscillatoriaceae*, a genus of *Oscillatoria*, species *Oscillatoria* SP S-3.

Culture S-4 - They developed well in a liquid medium and was a suspension of dark green color. On the agarized solid nutrient medium, the correct colonies are formed. Morphologically, the cells are oval in shape with rounded ends, sometimes slightly curved, the size of adult cells is 3.6-7.7 microns in length. Cell division is correct, after division, daughter cells sometimes remain connected in chains of two or four cells. It grows well at an air temperature of 22-35°C on the liquid medium of Zarruka (Fig.1). According to morphological characteristics, it is identified as a - class: *Synechococcophycideae*, Order: *Synechococcales*, Family: *Synechococcaceae*, a genus of *Synechococcus*, species *Synechococcus* SP S-4.

Culture S-5- The turf is dark blue-green. Trichomes are not narrowed at the ends and have pronounced constrictions in the places of the partitions. Trichomes are single, straight, and consist of spherical cells, among which heterocysts and, less often, akinets were found. Heterocysts are intercalary in most cases. The diameter of the trichomes is within 2-8 microns. The division takes place in one plane. On a liquid medium, it grows forming fouling on the vessel wall. The strain is autotrophic. It grows well at an air temperature of 22-30°C on liquid and agarized media BG-11 (Figure 1). According to morphological characteristics , it is identified as a - class: *Nostocophycideae*, Order: *Nostocales*, Family: *Nostocaceae*, a genus of *Anabaena*, species *Anabaena* SP S-5.

According to the results of the research, 5 algologically pure cyanobacteria cultures were isolated from the researched soil sample, but when obtaining bacteriologically pure cultures after treatment with antibiotics, 4 cyanobacteria cultures were obtained in pure form.



Phormidium SP S-2

Oscillatoria SP S-3

Synechococcus SP S-4

Anabaena SP S-5

Figure 1 - Isolated algologically and bacteriologically pure cyanobacteria cultures

Antibacterial activity of isolated cyanobacteria cultures

Cyanobacteria are producers of various bioactive molecules, the production of which has provided these organisms with evolutionary advantages. Allelochemical substances synthesized by cyanobacteria that perform the functions of signaling metabolites, as well as affecting the growth and development of other organisms, can have a toxic effect. In addition to toxins, cyanobacteria metabolites are rich in other active compounds with antibacterial, antifungal and antiviral effects [17, 18].

To study the antibacterial activity of the isolated strains of cyanobacteria, the biomass of cyanobacteria was obtained. Extracts with different solvents were obtained from the biomass of

cyanobacteria strains. The antibiotic ampicillin was used as a positive control. Obviously, the diameter of the inhibition zone depends on the type of cyanobacteria, the type of solvent used and the microorganisms tested.

Of the investigated cultures, the best antibacterial activity was shown by methanol extracts of *Oscillatoria* SP S-3 and *Anabaena* SP S-5 cultures. According to the results of the research, the diameter of the inhibition zone when searching the antibacterial effect of the methanol extract of the *Oscillatoria* SP S-3 culture was *E. coli* – 12 ± 0.02 mm, *Staphylococcus aureus* - 11 ± 0.01 mm. In *P. aeruginosa* and *B. subtilis* bacteria, the growth inhibition zone was only 9.2 ± 0.03 and 9.3 ± 0.01 mm, respectively (Table 2).

The highest antibacterial activity when studying the effect of methanol extract of *Anabaena* SP S-5 culture was measured against *B. subtilis* - 12 ± 0.05 mm and *E. coli* - 10.8 ± 0.01 mm, followed by *Staphylococcus aureus* - 9.2 ± 0.05 mm and *P. aeruginosa* - 8.5 ± 0.06 mm (Table 2).

Culture *Oscillatoria* SP S-3, showed moderate antibacterial activity against the studied test cultures of microorganisms (Table 2).

The bacterial strains searched by the test showed the least inhibition zones when studying the methanol extract of the *Synechococcus* SP S-4 culture. And the zone of no growth ranged from 0.9 to 2.5 mm.

Table 2 - Sensitivity (no growth zone, mm) of test microorganisms to various extracts of isolated cyanobacteria cultures

Cyanobacteria culture	Test culture of microorganisms	Extracts of isolated Cyanobacteria cultures	
		Methanol	Ethanol
<i>Phormidium</i> SP S-2	<i>P. aeruginosa</i>	5.5 ± 0.06	1.3 ± 0.02
	<i>B. subtilis</i>	4.3 ± 0.01	0.8 ± 0.06
	<i>E. coli</i>	3.2 ± 0.04	1.0 ± 0.04
	<i>St. aureus</i>	3.5 ± 0.02	1.2 ± 0.02
<i>Oscillatoria</i> SP S-3	<i>P. aeruginosa</i>	9.2 ± 0.03	5.6 ± 0.04
	<i>B. subtilis</i>	9.3 ± 0.01	4.3 ± 0.05
	<i>E. coli</i>	12 ± 0.02	6.6 ± 0.04
	<i>St. aureus</i>	11 ± 0.01	5.3 ± 0.01
<i>Synechococcus</i> SP S-4	<i>P. aeruginosa</i>	2.5 ± 0.01	0.5 ± 0.02
	<i>B. subtilis</i>	1.3 ± 0.03	0.2 ± 0.01
	<i>E. coli</i>	1.2 ± 0.01	0.3 ± 0.02
	<i>St. aureus</i>	0.9 ± 0.02	0.1 ± 0.02
<i>Anabaena</i> SP S-5	<i>P. aeruginosa</i>	8.5 ± 0.06	10.2 ± 0.03
	<i>B. subtilis</i>	12 ± 0.05	5.2 ± 0.04
	<i>E. coli</i>	10.8 ± 0.01	5.5 ± 0.01
	<i>St. aureus</i>	9.2 ± 0.05	4.6 ± 0.02

In the case of ethanol extract, the cultures *Oscillatoria* SP S-3 and *Anabaena* SP S-5 also showed antibacterial activity, but less pronounced compared to methanol extract. The zone of no growth of the *E. coli* bacterium was 6.6 ± 0.04 mm when using the ethanol extract of the *Oscillatoria* SP S-3 culture, while the methanol extract of this culture showed an inhibition diameter of 12 ± 0.02 mm. But active suppression of growth was noted in the bacterium *P. aeruginosa* in the study of ethanol extract of *Anabaena* SP S-5 culture and the inhibition zone was 10.2 ± 0.03 mm, while the absence zone of the test culture of methanol extract of the same culture was 8.5 ± 0.06 mm (Table 2).

Positive control (ampicillin) showed pronounced zones of absence of growth of the microorganisms investigated by the test and the inhibition diameter ranged from 18 to 20 mm.

The antibacterial effects of extracts of isolated cyanobacteria cultures were compared with commercial ampicillin antibiotics, and the results of this comparison are given in (Table 3) as an antibacterial index. According to the index data, the effectiveness of methanol extracts obtained from the culture of *Oscillatoria* SP S-3 and *Anabaena* SP S-5, especially against *E. coli*, was 66.6%

and 60% close to the effectiveness of the antibiotic ampicillin. Also, the culture of *Oscillatoria* SP S-3 has positive antibacterial activity to *St. aureus* -55%. *Anabaena* SP S5 culture also showed significant activity in inhibiting the growth of the culture and the antibacterial index was *E. coli* - 60% with methanol extract and *P. aeruginosa* -51% with ethanol extract.

Table 3 – Antibacterial index of extracts of isolated cyanobacteria cultures in %

Cyanobacteria culture	Test culture of microorganisms	Extracts of isolated Cyanobacteria cultures	
		Methanol	Ethanol
<i>Phormidium</i> SP S-2	<i>P. aeruginosa</i>	27,5	6,5
	<i>B. subtilis</i>	22,6	4,2
	<i>E. coli</i>	17,7	5,5
	<i>St. aureus</i>	17,5	6
<i>Oscillatoria</i> SP S-3	<i>P. aeruginosa</i>	46	28
	<i>B. subtilis</i>	48,9	22,6
	<i>E. coli</i>	66,6	36,6
	<i>St. aureus</i>	55	26,5
<i>Synechococcus</i> SP S-4	<i>P. aeruginosa</i>	12,5	2,5
	<i>B. subtilis</i>	6,8	1,0
	<i>E. coli</i>	6,6	1,6
	<i>St. aureus</i>	4,5	0,5
<i>Anabaena</i> SP S-5	<i>P. aeruginosa</i>	42,5	51
	<i>B. subtilis</i>	63,1	27,3
	<i>E. coli</i>	60	30,5
	<i>St. aureus</i>	46	23

Thus, according to the results of the research, it can be noted that of all the isolated strains of cyanobacteria, the cultures *Oscillatoria* SP S-3, *Anabaena* SP S-5 showed the maximum antibacterial activity, showing the largest areas of inhibition of the growth of test bacterial strains. Cultures of *Phormidium* SP S-2, *Synechococcus* SP S-4 showed low antibacterial activity against the studied strains of microorganisms. Ampicillin, a broad-spectrum antibiotic, inhibited the growth of all bacteria and there was a pronounced absence of a growth zone of all bacteria.

Conclusion

Cyanobacteria are considered one of the most promising but unused sources of natural products with potential antibacterial activity for the development of new drugs. Rice field ecosystems with their optimal levels of light, water, temperature, humidity and nutrient availability provide a favorable environment for the mass growth of cyanobacteria. According to the results of the research, 48 species of microalgae and cyanobacteria were identified from the soils of the acreage of the Akdala valley, of which 21 species were cyanobacteria. The main proportion of representatives of cyanobacteria were heterocystic forms. The dominance of filamentous heterocystic forms over other forms (unicellular and filamentous non-heterocystic) was also recorded on other soils of rice fields [19]. Although Cyanobacteria are ubiquitous in nature, it is reported that their greater number, which makes up more than half of the heterocystic population, grows in swampy rice fields, since rice fields provide very favorable conditions for the abundant growth of nitrogen-fixing cyanobacteria [20].

5 algological pure cyanobacteria cultures were isolated from certain types of cyanobacteria, but when obtaining bacteriologically pure cultures after treatment with antibiotics, 4 cyanobacteria cultures were obtained in pure form.

In recent decades, screening programs have shown that cyanobacteria are a potential source of new active substances for medicine and pharmacy, and numerous active compounds have been isolated [21]. In the course of evolution, cyanobacteria have developed various mechanisms of detoxification of substances capable of causing the death of other organisms [22]. The competitiveness of soil cyanobacteria is based, in particular, on their ability to synthesize

biologically active substances that suppress the reproduction of other microorganisms.

According to the results of the research, the cultures of *Oscillatoria* SP S-3, *Anabaena* SP S-5 showed the maximum antibacterial activity from the isolated four species of cyanobacteria, showing the largest areas of growth inhibition of the test strains of *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis* with methanol extracts. These results are consistent with the data of Osman R.K. et al. (2015), according to their results of selective selection of 14 species of cyanobacteria showed that *Fisherella* sp., *Oscillatoria* sp. and *Anabaena* sp. have antagonistic activity against gram-negative bacteria *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimuri* and gram-positive bacteria *S. aureus*, *B. segei* [23].

Extracts of various types of cyanobacteria obtained using various solvents showed different degrees of antibacterial activity against pathogenic microorganisms and were researched by different researchers. In a research conducted by Tiwari & Sharma cyanobacterial extracts of *Anabaena variabilis* and *Synechococcus elongatus* have shown significant antibacterial activity against *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp. and *E.coli* [24]. Other authors have observed significant antibacterial activity of *Anabaena variabilis* in crude extracts from chloroform and methanol against *B. subtilis* and *P. Aeruginosa* [25].

Numerous substances have been identified as antibacterial agents from cyanobacteria, such as chlorellin derivatives, acrylic acid, aliphatic compounds, terpenes, sulfur-containing heterophilic compounds, phenolic inhibitors, etc. [26]. They represent a huge, but still little-used resource for obtaining a large number of various biotechnologically important compounds, since they synthesize a variety of biologically active substances with different effects, including antifungal, antibacterial, and antiviral activity. And the search and isolation of new species of cyanobacteria and the right choice of producers of biologically active substances opens up great opportunities and prospects in agrobiotechnology. At the same time, compounds of natural origin, in comparison with synthetic ones, are easily biodegradable and are safe for the environment [27].

Funding

The work was carried out within the framework of the IRN AP14870201 project "Search and study of new secondary metabolites of cyanobacteria promising for use in agricultural biotechnology", AP13068051 «Development of technology for obtaining biological products based on strains of microalgae and cyanobacteria to increase the productivity of agricultural plants».

References:

- 1 Abed R.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106: 1–12.
- 2 Prasanna R., Sood A., Ratha S.K., Singh P.K., Naveen K. Sharma, Ashwani K. Rai and Lucas J. Sta (eds.). Cyanobacteria as a “green” option for sustainable agriculture. *Cyanobacteria: an economic perspective*, 2014, 9: 145-166.
- 3 Thajuddin, N., Subramanian, G. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 2005, 89 (1): 47-57.
- 4 Kreitlow, S., Mundt, S. & Lindequist, U. Cyanobacteria - a potential source of new biologically active substances. *Progress in Industrial Microbiology*, 1999, 35: 61-63.
- 5 Taskin E., Ozturk M., Taskin, E. & Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(24): 2746-2751.
- 6 Kim J.D. Screening of Cyanobacteria (Blue-Green algae) from Rice Paddy Soil for Antifungal Activity against Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology*, 2006, 34(3):138-42 (doi: 10.4489/MYCO.2006.34.3.138).
- 7 Derikvand P., Llewellyn C.A., Purton S. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: A comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, 2017, 52:43-56. (doi: 10.1080/09670262.2016.1214882).
- 8 Mallavarapu, M. Healthy levels of soil algae lift plant growth, CISRO land and water farming ahead, 2001, 120:21.

9 Bowman J.P., Rea S.M., McCammon S.A. et al. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Environmental Microbiology.*, 2000, 2: 227-237.

10 Gollerbah M. M., Poljanckij V. N. Precnovodnye vodorocli ih izuchenie. Izd-vo «Cov. nauka», 2001. Opredelitel' precnovodnyh vodoroclej CCCR. Vyp. 2. Cinezelenye vodorocli. M.: Izd-vo «Cov. nauka», 1953.

11 A M. Muzaferov, A. Je. Jergashev, S. Halilov. Opredelitel' sinezelenyh vodoroslej Srednej Azii, AN UzSSR, In-t botaniki, Tashkent, 1987.

12 Temraleeva A.D., Dronova S.A., Moskalenko S. V., Didovich S.V. Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. *Microbiology*, 2016, 85: 389–399.

13 Malathi, T., Ramesh Babu, M., Mounika, T., Snehalatha, D. & Digamber Rao Screening of cyanobacterial strains for antibacterial activity. *Phykos: Journal of the Phycological Society*, 2014, 44(2): 6-11.

14 Perez, C., Pauli, M. & Bazerque, P. An antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biologiae et Medecine Experimentalis*, 1990, 15: 113-115.

15 Poshanov M.N., Otarov A., Duisekov S.N., Elantseva N.V., Smanov Z.M., Suleimenova A.I. Calculation of water flow in using various methods of rice irrigation (drip irrigation and pressing). *Soil Science and Agrichemistry*, 2018, 4: 40-47.

16 Kulagin V.V., Shakibaev I.I., Murtazin E.Zh. Metodicheskie ukazanija po provedeniju monitoringa oroshaemyh zemel' Respubliki Kazahstan. Astana, 1998.

17 Koksharova O.A. Primerenie metodov molekuljarnoj genetiki i mikrobiologii v jekologii i biotekhnologii cianobakterij. *Mikrobiologija*, 2010, 79(6): 734-747.

18 Singh R., Parihar P., Singh M., Bajguz A., Kumar J., Singh S., Singh V. P., Prasad S. M. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Frontiers Microbiology*, 2017, 8: 515.

19 Abinandan S., Subashchandrabose SR., Venkateswarlu K., Megharaj M. Soil microalgae and cyanobacteria: the biotechnological potential in the maintenance of soil fertility and health. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(8): 981–998.

20 Bharadwaj N., Baruah P.P. Diversity and abundance of N₂-fixing cyanobacterial population in rice field soil crusts of Lower Brahmaputra Valley agro-climatic zone. *Journal Algal Biomass Utilization*, 4:23–33.

21 Chunleuchanon S., Sooksawang A., Teaumroong N., Boonkerd N. Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: population dynamics as affected by environmental factors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 19(2): 167–173.

22 Kumar B.N.P., Manabobi S., Satyam S. Cyanobacteria: a potential natural source for drug discovery and bioremediation. *Journal of Industrial Pollution Control*, 2016, 32 (2): 508–517.

23 Osman R.K., Goda H.A., Higazy A.M. Evalution of some extra- and intracellular cyanobacterial extractsas antimicrobial agents. *International Journal of Advanced Research*, 2015, 5: 852–864.

24 Tiwari, A. & Sharma, D. Antibacterial activity of bloom farming Cyanobacteria against clinically isolated human pathogenic microbes. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2013, 4 (1): 83-89.

25 Malathi, T., Ramesh Babu, M., Mounika, T., Snehalatha, D. & Digamber Rao, Screening of cyanobacterial strains for antibacterial activity. *Phykos: Journal of the Phycological Society*, 2014, 44(2): 6-11.

26 Lavanya R., Veerappan V. Antibacterial potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of southeast coast of India. *Advances in Biological Research*, 2011, 5(1): 38-44.

27 Ozdemir G., Karabay N.U., Dalay M.C., Pazarbasi B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother Res*, 2004, 18: 754-757.

МРНТИ: 34.15.23, 68.39.29

С.Т. ДАУГАЛИЕВА^{1*}, А.Т. ДАУГАЛИЕВА², А.И. АШАНИН², Б.Б. ЕРГАЛИ²¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан²Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства, Алматы, Казахстан

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА НА ПРОДУКТИВНОСТЬ БЫЧКОВ КАЗАХСКОЙ БЕЛОГОЛОВОЙ ПОРОДЫ И КОНЦЕНТРАЦИЮ АРХЕЙ В МИКРОБИОМЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.15

Аннотация

В статье приводятся сведения о влиянии рациона с добавлением семян льна на продуктивность бычков казахской белоголовой породы и выработку ими метана. Выработка метана зависит от концентрации архей в микробиоме желудочно-кишечного тракта животных. В результате проведенных исследований установлено, что введение семян льна в рационы бычков способствует привесам и увеличению выработки метана. Так, абсолютный прирост живой массы в опытной группе составил $124,5 \pm 6,95$ кг, в контрольной группе – $105,33 \pm 2,16$ кг. Использование семян льна привело к увеличению количества анаэробных бактерий и архей, то есть к увеличению выработки метана. На уровне семейств статистически значимая вариация численности метаногенов на 3-м месяце по сравнению с животными до кормления семенами льна, начала эксперимента, точки отсчета (T0), была подтверждена для *Methanocorpusculaceae* (увеличение в 255 раз), *Methanomethylophilaceae* (увеличение в 13 раз) и *Mathanobacteriaceae* (увеличение в 6 раз).

Ключевые слова: микробиом, крупный рогатый скот, казахская белоголовая, семена льна, секвенирование нового поколения.

Свыше половины метана в атмосфере – результат развития сельского хозяйства, прежде всего животноводства. Метан образуется в качестве побочного эффекта при пищеварительных процессах крупного рогатого скота. Выбросы метана животными в окружающую среду способствуют изменению климата. Метан приводит к парниковому эффекту: по сравнению с углекислым газом он способен задерживать больше тепла, чем диоксид углерода. Желудочные газы в результате неправильного питания и пищеварения животных становятся проблемой стран с развитым сельским хозяйством. К 2030 году ожидается увеличение температуры окружающей среды от 1,5 до 2 °C.

Казахстан - страна с развитым животноводством, в которой с каждым годом увеличивается поголовье крупного рогатого скота (КРС), соответственно, выделяется больше метана. Для уменьшения выбросов метана необходимо менять рацион коров [1]. Upadhyay D.C. с соавт. отмечают, что соотношение концентратов и грубого корма в рационе влияет на показатели роста животного, брожение в рубце, выбросы метана и здоровье животных [2]. Как правило, когда доля грубого корма выше, размножаются целлюлозоразрушающие бактерии и в рубце преобладает уксуснокислое брожение с выработкой водорода, что стимулирует массивное размножение архей. Увеличение численности архей ведет к увеличению выброса метана.

Однако, когда увеличивается доля концентратов в рационе, показатели pH в рубце снижаются, что сдерживает рост архей и инфузорий, при этом увеличивается выработка пропионовой кислоты. Ряд авторов установили, что состав органического вещества (углеводов) в рационе животных влияет на характер и скорость ферментации, а также на образование незаменимых жирных кислот (НЖК) и метана [3-5]. Рационы с крахмалом стимулируют продукцию пропионата и снижают выработку метана. Такие рационы влияют

на рН рубца и образование метана. Рационы с содержанием грубых кормов имеют обратное действие. Влияние состава рациона на эмиссию метана установили и другие учёные [6, 7]. В Индии установлено, что Голштинские коровы питаются качественными рационами и производят в 6–7 раз меньше метана на 1 л молока, чем местные, что позволяет снизить эмиссию метана на 20–30% за счёт поголовья [8]. Другим способом снижения метаногенеза в рубце может быть ингибирование за счёт образования альтернативных продуктов. Так, ацетогенные бактерии в толстом кишечнике млекопитающих производят уксусную кислоту при редукции CO_2 с участием H_2 , образуемого в процессе ферментации углеводов в толстом кишечнике [9]. Обогащение рациона животных жирами ведёт к уменьшению инфузорий в рубце и снижению метана, причём источник жира влияет на эффективность его действия [10, 11, 12]. Показано ингибирование метаногенеза при добавлении жиров (например, семян льна) к рациону [13]. При добавлении к корму пробиотика из гриба *Aspergillus oryzae* уменьшается образование метана в рубце на 50%, что связано со снижением количества инфузорий в рубцовом содержимом (на 45%) [14]. Добавление *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* в инкубационную систему ведёт к сокращению метана на 10%, в то время как добавление *in vivo* — не влияет на неё [15]. Разложение растительной клетчатки происходит в результате гидролиза полисахаридов на мономеры. Мономеры ферментируются ацидогенезом, что приводит к образованию органических и короткоцепочечных жирных кислот. Также образуются водород (H_2) и углекислый газ (CO_2). Метаногены удаляют H_2 путём восстановления CO_2 с образованием метана [16, 17]. Поэтому понимание микробного состава желудочно-кишечного тракта жвачных животных важно для оценки степени выработки метана. Разработка диеты для крупного рогатого скота с целью снижения эмиссии метана и его негативного воздействия на окружающую среду является актуальной глобальной экологической проблемой.

Материалы и методы

Исследования влияния добавления семян льна в рацион на микробиоту желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) коров проводились в к/х «Кулдыбаев Даuletgali», Карагандинского района, Жетысуской области, в испытательном центре по определению химического состава кормов и качества продукции ТОО «КазНИИЖиК» и в лаборатории молекулярно-генетических исследований ТОО «НПЦ Микробиологии и вирусологии». В качестве объекта исследования служили бычки казахской белоголовой породы в возрасте 8–10 мес. со средней начальной живой массой 180–210 кг и среднесуточным приростом 1100–1200 г. Кормовая база была представлена сеном разнотравным, силосом кукурузным, кукурузой, отрубями пшеничными. Химический анализ кормов проводили согласно ГОСТ 32040–2021 г. Для изучения химического состава кормов использовался прибор Инфразак фирмы FOSS (Дания). Животных содержали на открытых площадках, без привязи. Кормление осуществлялось дважды в сутки. После изучения химического состава кормов и формирования подопытных групп с учётом живой массы и среднесуточных приростов животных были разработаны рационы для подопытных групп. При создании рационов были использованы нормы кормления сельскохозяйственных животных, разработанные ВГНИИ животноводства [18]. В ходе опыта один раз в месяц проводился учёт продуктивности животных и поедаемости кормов. Количественные данные были обработаны методом вариационной статистики [19]. В соответствии со стандартными значениями критерия достоверности (по Стьюденту) применялись три уровня вероятности: 0,95; 0,99 и 0,999. При $P < 0,95$ различия между группами считались не достоверными. Если уровень вероятности выше указанных показателей, то различия считались достоверными с ошибкой в 0,05; 0,01 и 0,001%.

Исследование микробиома бычков проведено с помощью *16S* метагеномного анализа на секвенаторе Illumina MiSeq по технологии секвенирования нового поколения (NGS). Для анализа были отобраны образцы фекалий ректально. Образцы были собраны у трех бычков до кормления рационом с семенами льна (T0), а затем в первый, второй и третий месяцы

после кормления. Кроме того, в опыт в качестве контроля были включены три животных, которым семена льна не давали. Образцы были доставлены в лабораторию в термочемодане с хладоэлементами и хранились при -20 °C [20]. Для выделения ДНК было взято 250 мг образцов фекалий. ДНК выделяли набором для выделения ДНК микробиома PureLink™ (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Генетические библиотеки для метагеномного *16S* секвенирования были подготовлены в соответствии с руководством (№ 15044223 rev. A). Готовые библиотеки с PhiX секвенировали с помощью набора MiSeq® Reagent Kit v3 на 600 циклов (Illumina Inc., США).

Данные *16S* метабаркодирования образцов проанализированы с помощью рабочих процессов Data QC. Данные сгенерированы из прогона MiSeq и состояли из демультиплексированных файлов fastq, которые были импортированы в программное обеспечение CLC Genomics Workbench v. 22. (Qiagen). Перед началом кластеризации риды были обрезаны, а чтения с низким охватом были удалены из анализа. Последовательности *16S* праймеров для секвенирования предоставлялись в формате clc. В качестве базы данных при анализе использовалась SILVA SSU v. 138. (www.arb-silva.de/documentation/release-138).

В модуле CLC Microbial Genomics для измерения альфа- и бета-разнообразия использовалось филогенетическое дерево всех OTU (филогенетическое разнообразие и расстояния UniFrac). Филогенетическое дерево реконструировалось с использованием подхода максимального правдоподобия, основанного на выравнивании последовательностей (MSA) OTU, сгенерированных в стенде MUSCLE. С целью оценки сходства между образцами проведён дифференциальный анализ численности с тем, чтобы найти операционные таксономические единицы (OTU), которые имеют наиболее различающуюся численность в образцах. Достоверность результатов оценена анализом PERMANOVA, который можно использовать для измерения величины эффекта и значимости бета-разнообразия.

Результаты и обсуждение

В результате исследования кормов установлено, что качество кормов в к/х «Кулдыбаев Даuletgali» было средним. Так, сено разнотравное по содержанию сырого протеина и сырой золы следует отнести к 1-му классу, по содержанию сырой клетчатки – ко 2-му классу. Однако по содержанию сухого вещества сено не является классным. Силос кукурузный в соответствии с ГОСТ Р 55986–2014 по содержанию сухого вещества, сырого протеина и сырой клетчатки отнесен к 1-му классу, а по концентрации сырой золы в сухом веществе корма – к 3-му классу. Для проведения научно-хозяйственного опыта было сформировано две подопытные группы бычков по 10 голов в каждой по принципу пар аналогов [21] (таблица 1).

Таблица 1 – Схема научно-хозяйственного опыта на бычках

Группа	Количество голов	Условия кормления
Контрольная	10	Базовый рацион (БР)
Опытная	10	БР + зерно льна

Отличие рационов подопытных групп животных заключалось в том, что опытная группа в рационе получала семена льна. При этом грубые корма в структуре рациона контрольной группы занимали 22,0%. На сочные корма приходилось 20,0%. Доля концентрированных кормов составляла 58,0%. Аналогичная структура рационов была и в опытной группе. Так, на долю грубых кормов приходилось 22,5%, на долю сочных – 19,5%. Доля концентратов в рационе составляла 58,0 %. В том числе на семена льна приходилось 9,2%. Поедаемость сена в контрольной группе составила 86,3%, силоса - 96,47%, концентраты поедались полностью. В опытной группе поедаемость сена составила 86,43%,

силоса кукурузного - 96,5%, концентраты поедались полностью. Из полученных данных следует, что поедаемость кормов была одинаковой в обеих группах. В среднем, в сутки животные обеих групп потребляли одинаковое количество сухого вещества (7,53 кг). При этом потребление энергии было выше в опытной группе на 5,13%, сырого протеина - на 2,0%, перевариваемого протеина – на 3,14%, а сырого жира – на 56,6%, что связано с введением в рацион семян льна в количестве 500 г на голову в сутки. Введение в рацион опытной группы семян льна оказало положительное влияние на продуктивность животных. Так, абсолютный прирост живой массы в опытной группе составил $124,5 \pm 6,95$ кг, а в контрольной группе – $105,33 \pm 2,16$ кг. Превышение составило 19,17 кг или 18,2 относительных процента ($P > 0,95$). Среднесуточный прирост живой массы в опытной группе был выше и составил $1270,40 \pm 70,94$ г. против $1074,8 \pm 22,01$ г. Превышение составило 195,6 г или 18,2 относительных процента ($P > 0,95$). Такая разница связана с тем, что рационы опытной группы содержали в составе больше энергии, сырого и перевариваемого протеина и жира. Увеличение среднесуточных приростов живой массы бычков опытной группы показало эффективность затрат кормов на 1 кг прироста живой массы. Так, в контрольной группе они составили 7,26 ЭКЕ (энергетических кормовых единиц), а в опытной – 6,45 ЭКЕ или меньше на 0,81 ЭКЕ, что составило 12,6%. Наряду с этим, изучено содержание анаэробных бактерий и архей в фекалиях подопытных животных. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Содержание анаэробных бактерий и архей в фекалиях подопытных животных, %

Микробиота	Группа бычков		Уровень вероятности
	КГ	ОГ	
Анаэробные бактерии	$98,67 \pm 0,18$	$99,52 \pm 0,03$	$P > 0,95$
Археи	$0,02 \pm 0,01$	$0,2 \pm 0,01$	$P > 0,999$

Из данных таблицы 2 следует, что наиболее высокая концентрация архей содержится в опытной группе ($0,2 \pm 0,01\%$) по сравнению с контрольной группой бычков ($0,02 \pm 0,01\%$), увеличение - 0,18 абсолютных процента или в 10,0 раз ($P > 0,999$). Анализ полученных данных показал, что введение семян льна в рационы бычков способствует увеличению количества анаэробных бактерий при одновременном повышении концентрации архей.

В результате проведения биоинформационической обработки получены сгенерированные кластеры OTU, которые предоставлены на рисунке 1.

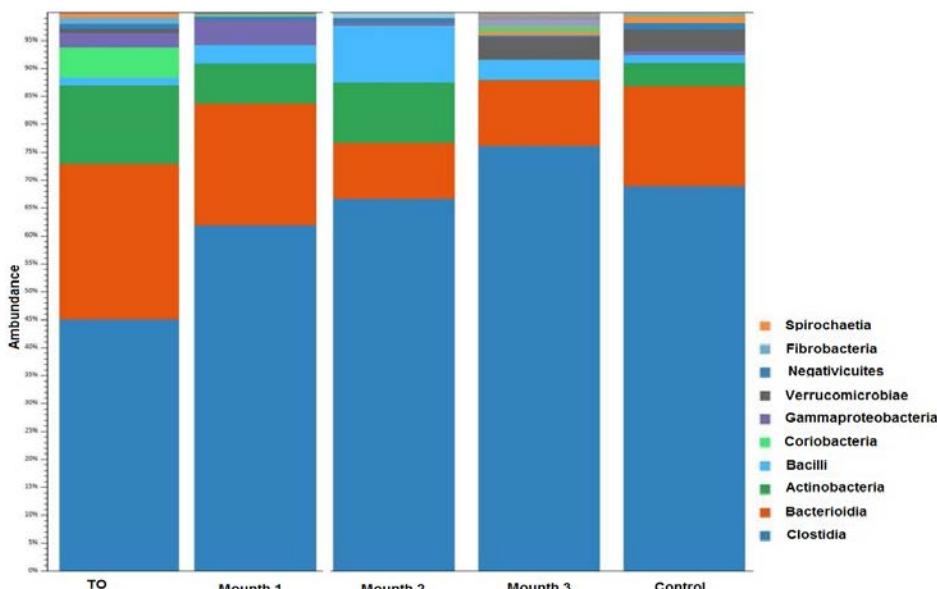


Рисунок 1 – Микробиота бычков на уровне класса в образцах, сгруппированных по кормлению семенами льна

На рисунке 1 показано увеличение численности *Clostridia* с Т0 по 3-й месяц кормления семенами льна, тогда как количество *Bacteroidia* уменьшается. Эти результаты были дополнительно оценены путём проведения статистического анализа образцов.

Альфа-разнообразие нанесено на диаграмму путём группировки образцов введение семян льна (рисунок 2).

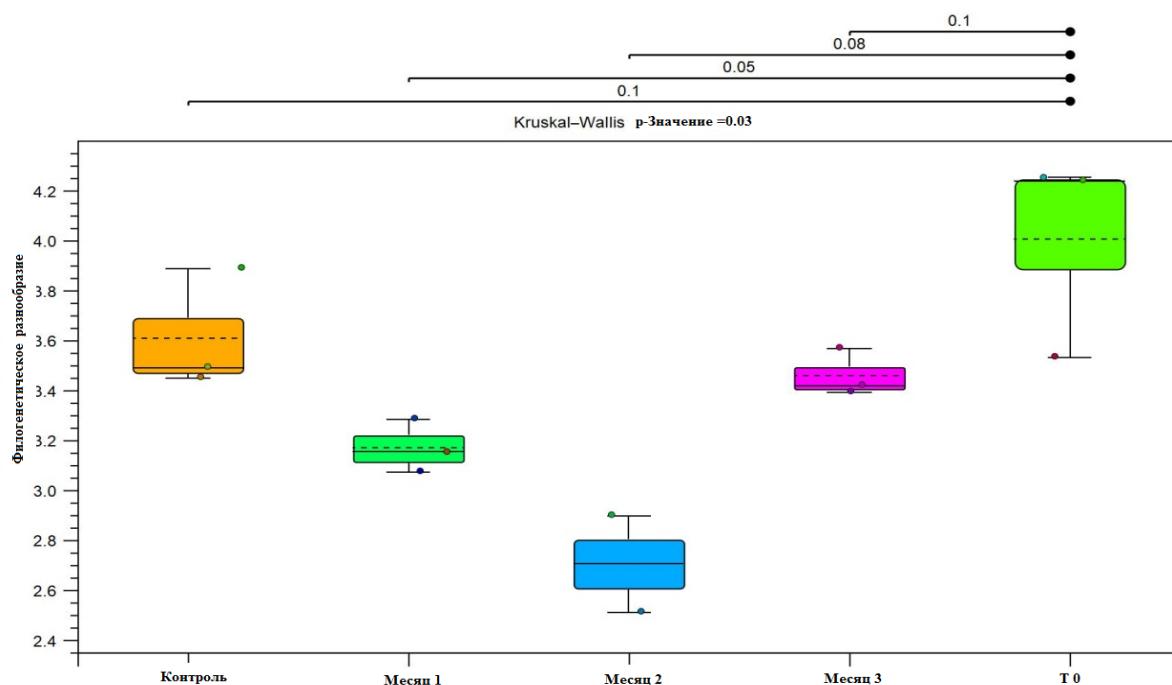


Рисунок 2 - Альфа-разнообразие – прямоугольная диаграмма при кормлении льном

Рисунок показывает значительное разделение групп кормления ($p= 0,03$).

Анализ бета-разнообразия показывает анализ основных координат (PCoA) на расстояниях UniFrac (рисунок 3).

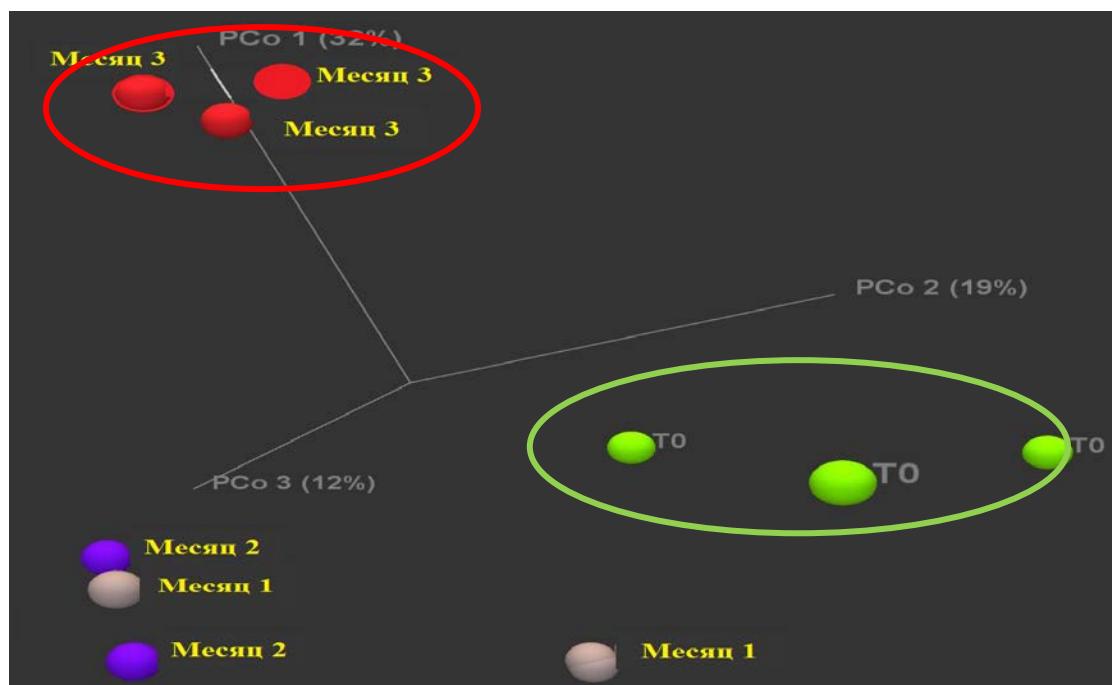


Рисунок 3 - Результат анализа бета-разнообразия — PCoA

В РСоА сферы бета-разнообразия на графике окрашены в соответствии с метаданными (кормление рационом с семенами льна). Интересно, что в этом анализе микробиота в Т0 и через 3 месяца после кормления семенами льна чётко сгруппирована в два разных кластера. Животные через 1 и 2 месяца также отделены от первых групп, но имеют тенденцию смешиваться друг с другом. РСоА предполагает постепенное изменение состава микробиоты после кормления семенами льна.

Таблица 3 - Результат пермутационного многомерного дисперсионного анализа (ПЕРМАНОВА) анализ (Брай Кертис)

Группы		Псевдостатистика	р-значение	
		2.50489	0.00246	
Группа 1	Группа 2	Псевдостатистика	Р-значение	Р-значение (Бонферрони)
До	Месяц 2	0,78822	0,90000	1,00000
До	Месяц 2	1,62391	0,10000	1,00000
Месяц 2	Месяц 3	2,18331	0,10000	1,00000
До	Контроль	2,06822	0,10000	1,00000
Месяц 2	Контроль	4,79052	0,10000	1,00000
Месяц 3	Контроль	11,24487	0,10000	1,00000
До	Месяц 1	1,03102	0,50000	1,00000
Месяц 2	Месяц 1	0,78543	0,60000	1,00000
Месяц 3	Месяц 1	5,38830	0,10000	1,00000
Контроль	Месяц 1	5,03025	0,10000	1,00000
PERMANOVA анализ (Жаккард)				
Переменная	Группы		Псевдостатистика	р-значение
Кормление	До, Месяц 2, Месяц 3, Контроль, Месяц 1		2,17219	0,00051
Группа 1	Группа 2	Псевдостатистика	Р-значение	Р-значение (Бонферрони)
До	Месяц 2	0,92241	0,80000	1,00000
До	Месяц 2	1,98391	0,10000	1,00000
Месяц 2	Месяц 3	1,97859	0,10000	1,00000
До	Контроль	1,69119	0,10000	1,00000
Месяц 2	Контроль	2,97312	0,10000	1,00000
Месяц 3	Контроль	6,45427	0,10000	1,00000
До	Месяц 1	1,18759	0,20000	1,00000
Месяц 2	Месяц 1	0,85116	0,60000	1,00000
Месяц 3	Месяц 1	3,95923	0,10000	1,00000
Контроль	Месяц 1	3,20675	0,10000	1,00000

Метаногены. Биоинформационический анализ проводился на 3-х таксономических уровнях: класс, семейство и род.

Для проверки наличия разницы между двумя группами проведён дифференциальный анализ численности архей (таблица 4). Результат этого анализа показал 6-кратное и 285-кратное увеличение численности архей классов *Methanobacteria* и *Methanomicrobia*, соответственно, после введения в рацион семян льна в течение 3-х месяцев. Эти значения статистически подтверждены, поскольку показатели р значительно ниже порогового значения ($p<0,05$).

Таблица 4 - ОТУ Дифференциальный анализ численности на уровне класса

Наименование класса	Изменение сгиба	Р-значение
<i>Methanobacteria</i>	5,91	7,95E-3
<i>Methanomicrobia</i>	258,21	1,54E-3

Тот же подход применён на уровне семейств и родов (рисунок 4), что подтверждает увеличение содержания метаногенов на 3-м месяце по сравнению с животными до кормления семенами льна (T0). В частности, метаногенный компонент микробиоты желудочно-кишечного тракта КРС идентифицирован как семейства *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylphilaceae* и как роды *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*.

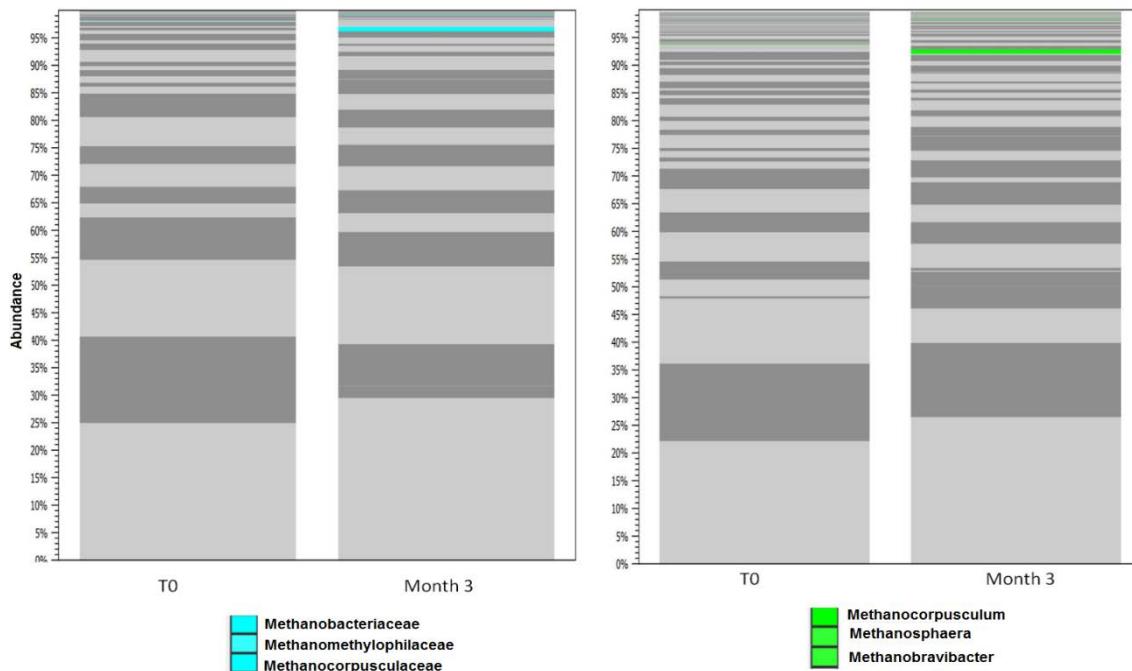


Рисунок 4 - Микрофлора бычков на уровнях семейств и родов архей в образцах, сгруппированных по кормлению семенами льна. Компонент метаногена окрашен в светло-голубой и зелёный цвета

Точно так же дифференциальный анализ численности был выполнен для семейств и родов метаногенов (таблицы 5, 6). На уровне семейства статистически значимая вариация численности на 3-м месяце по сравнению с животными до кормления семенами льна (T0) была подтверждена для *Methanocorpusculaceae* (увеличение в 255 раз) и *Methanobacteriaceae* (увеличение в 6 раз). Результаты также показали 13-кратное увеличение *Methanomethylphilaceae*.

Таблица 5 - ОТУ Дифференциальный анализ численности на уровне семейств архей

Наименование	Изменение сгиба	P-значение
<i>Methanocorpusculaceae</i>	254,81	1,36E-3
<i>Methanobacteriaceae</i>	6,05	0,02
<i>Methanomethylphilaceae</i>	12,72	0,07

Таблица 6 -ОТУ Дифференциальный анализ численности на уровне родов архей

Наименование	Изменение сгиба	P-значение
<i>Methanocorpusculum</i>	166,92	0,08
<i>Methanospaera</i>	-1,51	0,52
<i>Methanobrevibacter</i>	1,00	0,98

Создана тепловая карта (рисунок 5), включающая все экспериментальные группы (контроль, до кормления семенами льна (T0), месяц 1, 2, 3) на основе таблицы операционных таксономических единиц (OTU), чтобы сохранить всю таксономическую информацию в анализе.

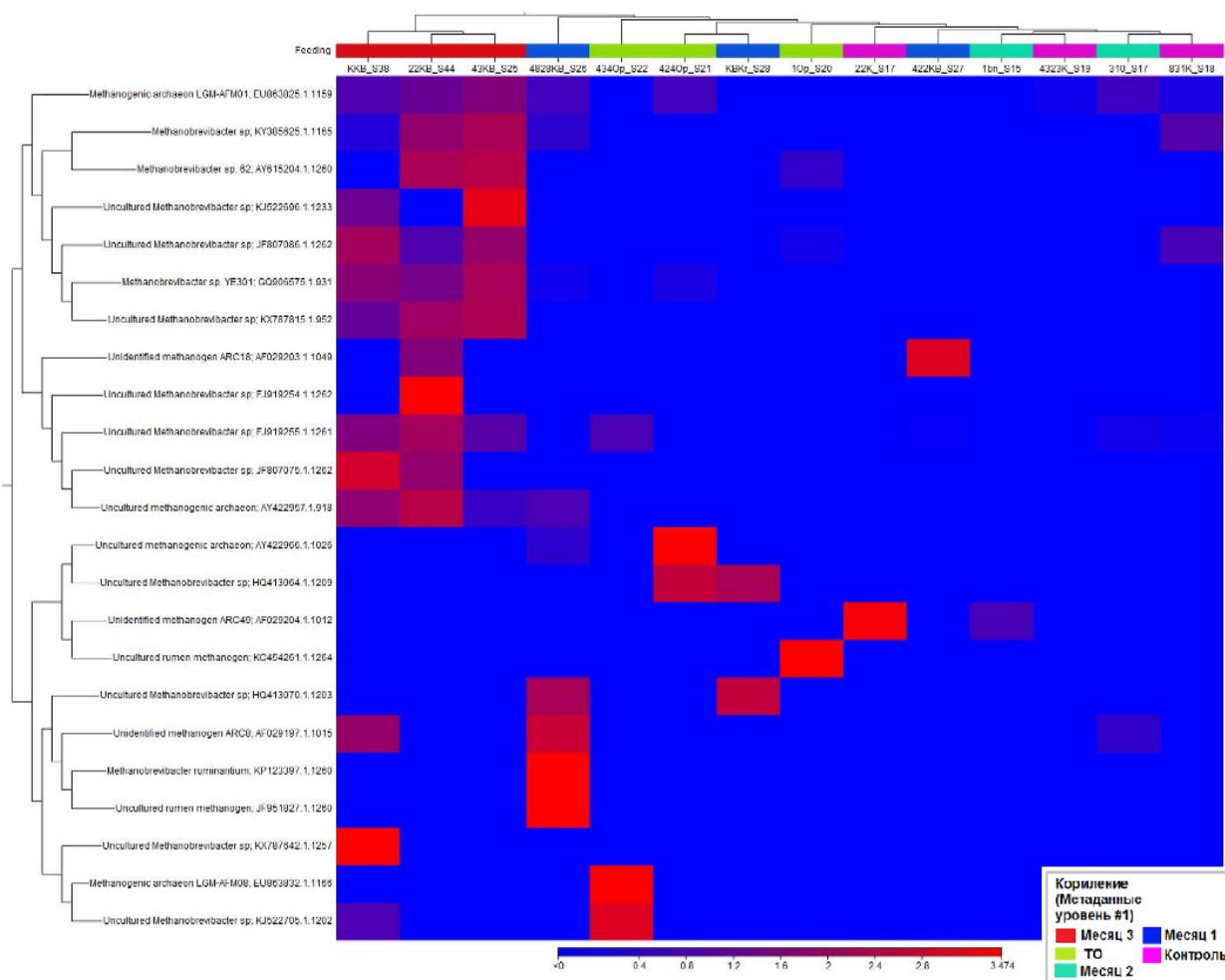


Рисунок 5 - Тепловая карта таблицы OTU по метаногенам

Этот анализ также весьма информативен, так как показывает, что увеличение метаногенов незначительно до 2-х месяцев после кормления семенами льна, в то время как с третьего месяца начинает увеличиваться метаногенная составляющая микробиоты желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота.

Заключение

В опытной группе бычков, в рационе которых были семена льна, наблюдался больший прирост живой массы по сравнению с контрольной группой. В результате проведенного метагеномного анализа выявлено, что введение семян льна в рационы бычков способствует увеличению количества анаэробных бактерий и архей (семейств *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylophilaceae* и родов *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*), что способствует повышению продуктивности бычков, но в то же время повышается эмиссия метана, что негативно влияет на окружающую среду. Необходимо проведение дальнейших исследований для разработки рационов с целью уменьшения выработки метана.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № АР09259133).

Литература:

- 1 Коровы как источник парникового эффекта? 2016. URL: <https://ru.euronews.com/methane-gas-threatening-to-slow-efforts-to-slow-climate-change>.
- 2 Upadhyay D.C., Subash Dhar, Dong Hongmin, Bruce A., Kimball Amit Garg, Jigeesha Upadhyay. Технологии для смягчения последствий изменения климата. Нью-Дели, 2012. 141 с.
- 3 Лучка И.В., Богданов, Г.О., Сологуб Л.І., Федяков Р.О., Герасимів М.Г. Вплив вуглеводів та их метаболітів на метаноутворення і продукцію летких жирних кислот мікроорганізмами рубця телят. В сб.: НТБ Інституту біол. наук УААН. К., 2004: 53-56.
- 4 Лучка И.В., Богданов Г.О., Сологуб Л.І., Янович В.Г., Герасимів М.Г. Утворення метану в рубці великого рогатого худоби Західної України за різного типу годівлі. В сб.: НТБ Інституту біол. наук УААН. К., 2005: 77-80.
- 5 Мелікян С.М., Лучка, И.В., Сологуб Л.І. До ренуляція редукцій нітратів і утворення метану у рубці телят. В сб.: НТБ Інституту біол. наук УААН. К., 2006: 188-192.
- 6 Moss A.R. Methane production by ruminants — literature review: I. Dietary manipulation to reduce methane production. *Laboratory procedures for estimating methane potential of diets Nutrition Abstracts and Reviews*, 1994, 64:786-806.
- 7 Lana R.P., Russell J.B., Van Amburgh M.E. The role of pH in regulating methane and ammonia production. *Animal Science*, 1998, 76:2190-2196 (doi: 10.2527/1998.7682190x).
- 8 Fahey G.C., Berger L.L. Carbohydrate nutrition in ruminants. In: The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition. D.C. Church (ed.). В сб.: *Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey*, 1988: 269-297.
- 9 Demeyer D.I., De Graeve K. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1991, 22: 50-61.
- 10 Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. The effect of the novel ionophore tetratolasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 544-547 (doi.org/10.1128/aem.54.2.544-547.1988).
- 11 Czerkawski J.W., Christie W.W., Breckenridge G., Hunter, M.L. Changes in rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *British Journal of Nutrition*, 1995, 34: 25-44 (doi: 10.1017/s0007114575000074).
- 12 Machmuller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuzer M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 1998, 77:117-130 (doi: 10.1016/S0377-8401(97)00126-0).
- 13 Dohme F., Machmuller A., Estermann B.L., Wasserfalle, A., Kreuzer, M. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 2: 187-193 (doi: 10.3389/fmicb.2015.01313).
- 14 Frumholtz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *The Journal of Agricultural Science (Camb.)*, 1989, 113:169-172.
- 15 Mathieu F., Jouany J.P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, 1996, 36, 271-287 (doi: 10.1051/rnd:19960305).
- 16 Ishler, V., Heinrichs J., Varga G. *From feed to milk: understanding rumen function*. The Pennsylvania State University, 1996.
- 17 Morgavi D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold C.J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 2021, 6 (5): 871 (doi: 10.1017/S1751731110000546).
- 18 Калашников А.П., Фисинин В.И., Щеглов В.В. *Нормы и рационы кормления с.-х. животных*. М., 2003. 305 с.
- 19 Яковенко А.М., Антоненко Т.И., Селионова М.И. *Биометрические методы анализа качественных и количественных признаков в зоотехнии*. М., 2013. 91 с.
- 20 Shoukun J., Hongtao Zh., Hui Y., Arash A., Haitao Shi., Gibson A., Shengl L., Zhijun C., and Yajing W. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta rumen liquid and

solid fractions in lactating in Holstein cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8:16 (doi: 10.1186/s40104-017-0142-z).

21 Овсяников А.И. *Основы опытного дела в животноводстве*. М., 1976. 304 с.

С.Т. ДАУГАЛИЕВА^{1*}, А.Т. ДАУГАЛИЕВА², А.И. АШАНИН², Б.Б. ЕРГАЛИ²

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

²Қазақ мал шаруашылығы және жемшөп өндірісі ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

ЗЫГЫР ТҮҚЫМЫМЕН АЗЫҚТАНДЫРУДЫҢ ҚАЗАҚТЫҢ АҚБАС ТҮҚЫМЫ БҮҚАШЫҚТАРЫНЫң АСҚАЗАН-ІШЕК ЖОЛЫ МИКРОБИОМАСЫНДАҒЫ АРХЕЙЛЕРДІҢ ӨНІМДІЛІГІ МЕН ШОҒЫРЛАНУЫНА ӘСЕРІ

Түйін

Мақалада зығыр түқымы қосылған рационның қазактың ақбас түқымды бұқалардың өнімділігіне және олардың метан өндіруіне әсері туралы ақпарат берілген. Метан бөлінісі жануарлардың асқазан-ішек микробиомасындағы архейлердің мөлшеріне байланысты. Зерттеу нәтижесінде бұқалардың рационына зығыр түқымын енгізу салмақтың өсуіне және метан өндірісінің артуына ықпал ететіні анықталды. Сонымен, тәжірибелік топтың тірілей салмағының абсолютті өсуі $124,5 \pm 6,95$ кг, ал бақылау тобында $105,33 \pm 2,16$ кг. Зығыр түқымын пайдалану анаэробты бактериялар мен архейлердің көбеюіне, яғни метан өндірісінің артуына әкелді. Түқымдық денгейде зығыр түқымымен қоректенгенге дейін жануарлармен салыстырғанда 3-ші айда метаногендер санының статистикалық маңызды өзгеруі, эксперименттің басталуы, анықтамалық нүктө (T0) *Methanocorpusculaceae* (255 есе өсу), *Methanomethyphilaceae* (13 есе өсу) және *Mathanobacteriaceae* (6 есе өсу) расталды.

Кілтті сөздер: микробиом, ірі қара мал, қазактың ақ басы, зығыр түқымдары, жаңа үрпақ секвендеу.

IRSTI: 34.15.23, 68.39.29

S.T. DAUGALIYEVA^{1*}, A.T. DAUGALYIEVA², A.I. ASHANIN², B.B. YERGALI²

¹Research and production center of microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh Research Institute for livestock and Fodder Production, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: saule.daugalieva@mail.ru

INFLUENCE OF THE DIET ON THE PRODUCTIVITY OF THE KAZAKH WHITE HEAD STEERS AND CONCENTRATION OF ARCHAEOA IN THE GASTROINTESTINAL TRACT MICROBIOME

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.15

Abstract

The article provides information on the effect of a diet with the addition of flax seeds on the productivity of the steers of the Kazakh white-headed breed and their production of methane. The production of methane depends on the concentration of archaea in the microbiome of the gastrointestinal tract of animals. As a result of the research, it was found that the introduction of flax seeds into the diets of the steers contributes to weight gain and an increase in methane production. Thus, the absolute increase in live weight in the experimental group was 124.5 ± 6.95 kg, in the control group - 105.33 ± 2.16 kg. The use of flax seeds has led to an increase in the number of anaerobic bacteria and archaea, that is, to an increase in methane production. At the family level,

a statistically significant variation in the abundance of methanogens at 3 months compared to animals before flax seed feeding, beginning of the experiment, baseline (T0) was confirmed for *Methanocorpusculaceae* (255-fold increase), *Methanomethylophilaceae* (13-fold increase) and *Mathanobacteriaceae* (increase 6 times).

Keywords: microbiome, cattle, Kazakh white-headed, flax seeds, new generation sequencing.

More than half of the methane in the atmosphere are the result of the development of agriculture, primarily animal husbandry. Methane is produced as a side effect of the digestive processes of cattle. Methane emissions from animals into the environment contribute to climate change. Methane leads to the greenhouse effect: compared to carbon dioxide, it is able to retain more heat than carbon dioxide. Stomach gases, as a result of malnutrition and digestion of animals, are becoming a problem in countries with developed agriculture. By 2030, the ambient temperature is expected to increase from 1.5 to 2°C.

Kazakhstan is a country with a developed animal husbandry, in which the number of cattle is increasing every year, respectively, more methane is emitted. To reduce methane emissions, it is necessary to change the diet of cows [1]. Pretty D.C., Char S., Hongmin D. et al. [2] note that the ratio of concentrates and coarse feed in the diet affects the growth of the animal, fermentation in the rumen, methane emissions and animal health [2]. As a rule, when the proportion of coarse feed is higher, cellulose-destroying bacteria multiply and acetic acid fermentation with hydrogen production prevails in the rumen, which stimulates massive reproduction of archaea with an increase in methane emissions. However, when the proportion of concentrate in the diet is increased, the pH in the rumen decreases, which inhibits the growth of archaea and ciliates, while increasing the production of propionic acid. A number of authors have established that the composition of organic matter (carbohydrates) in the diet of animals affects the nature and rate of fermentation, as well as the formation of essential fatty acids (EFAs) and methane [3–5]. Starch diets stimulate propionate production and reduce methane production. Such diets affect the rumen pH and the formation of methane. Diets containing coarse feed have the opposite effect. Rations containing roughage have the opposite effect. The influence of diet composition on methane emission was also established by other scientists [6, 7]. In India, it was found [8] that Holstein cows eat high-quality diets and produce 6-7 times less methane per 1 liter of milk than local cows, which reduces methane emissions by 20-30% due to livestock. Another way to reduce methanogenesis in the rumen may be inhibited due to the formation of alternative products. Thus, acetogenic bacteria in the large intestine of mammals produce acetic acid during the reduction of CO₂ with the participation of H₂ formed during the fermentation of carbohydrates in the large intestine [9]. The enrichment of the animal diet with fats leads to a decrease in the infusoria in the rumen [10, 11] and a decrease in methane, and the source of fat affects the effectiveness of its action [12]. The inhibition of melanogenesis has been shown with the addition of fats (for example, flax seeds) to the diet [13]. When a probiotic from the fungus *Aspergillus oryzae* is added to the feed, the formation of methane in the rumen decreases by 50%, which is associated with a decrease in the number of infusoria in the rumen contents (by 45%) [14]. The addition of *Saccharomyces cerevisiae* *in vitro* to the incubation system leads to a 10% reduction in methane, while the addition *in vivo* does not affect it [15].

The decomposition of plant fiber occurs as a result of the hydrolysis of polysaccharides into monomers. The monomers are fermented by acidogenesis resulting in organic and short chain fatty acids. Hydrogen (H₂) and carbon dioxide (CO₂) are also produced. Methanogens remove H₂ by reducing CO₂ to form methane [16, 17]. Therefore, understanding the microbial composition of the gastrointestinal tract of ruminants is important to assess the extent of methane production. The development of a diet for cattle in order to reduce methane emissions and its negative impact on the environment is an urgent global environmental problem.

Materials and methods

Studies of the effect of adding flax seeds to the diet on the microbiota of the gastrointestinal tract (GIT) of cows were carried out in the farm "Kuldybaev Dauletgali", Karatal district, Zhetsu region, in the testing center for determining the chemical composition of feed and product quality of LLP "Kazakh Research Institute for livestock and Fodder Production" and in the laboratory molecular genetic research of LLP "SPC of Microbiology and Virology".

Kazakh white-headed steers aged 8-10 months served as the object of the study, with an average initial live weight of 180-210 kg and an average daily increase of 1100-1200 g. The fodder base was represented by mixed hay, corn silage, corn, wheat bran. Chemical analysis of feed was carried out according to State standart 32040-2021. To study the chemical composition of the feed, an Infrasound device from FOSS (Denmark) was used. The animals were kept in open areas, without a leash. Feeding was carried out twice a day. After studying the chemical composition of feed and the formation of experimental groups, taking into account the live weight and average daily gains of animals, rations for experimental groups were developed. When developing diets, the norms of feeding farm animals developed by the Institute of Animal Husbandry were used [18]. During the experiment, once a month, the productivity of animals and feed consumption were taken into account. The digital material was processed by the method of variation statistics [19]. In accordance with the standard values of the reliability criterion (according to Student), three levels of probability were used: 0.95; 0.99 and 0.999. At $P < 0.95$, the differences between the groups were considered insignificant. If the probability level of the above indicators, then the differences are considered reliable with an error of 0.05, 0.01 and 0.001%.

The study of the steers microbiome was carried out using 16S metagenomic analysis on the Illumina MiSeq sequencer using new generation sequencing technology (NGS). Fecal samples were taken rectally from the steers for analysis. Samples were collected from 3 steers before feeding with flax seeds (T0), and then in the first, second and third months after feeding. In addition, 3 animals that were not given flax seeds were included in the experiment as a control. The samples were delivered to the laboratory in a thermowell with refrigerating elements and stored at -20 °C [20]. 250 mg of fecal samples were taken to isolate DNA. DNA was isolated with a PureLink™ microbiome DNA isolation kit (Invitrogen, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Genetic libraries for metagenomic 16S sequencing were prepared in accordance with the guidelines (No. 15044223 rev A). The finished libraries with PhiX were sequenced using the MiSeq ® Reagent Kit v3 for 600 cycles (Illumina Inc., USA).

The 16S metabarcoding data of the samples was analyzed using Data QC workflows. The data was generated from the MiSeq run and consisted of demultiplexed fastq files that were imported into the CLC Genomics Workbench v software. 22. (Qiagen). Before clustering started, the reads were truncated and the low-coverage reads were removed from the analysis. Sequences of 16S primers for sequencing were provided in .clc. format. SILVA SSU v. 138. was used as a database in the analysis. (www.arb-silva.de/documentation/release-138).

In the CALC Microbial Genomics module, a phylogenetic tree of all OTU (phylogenetic diversity and UniFrac distances) was used to measure alpha and beta diversity. The phylogenetic tree was reconstructed using a maximum likelihood approach based on the alignment of OTU sequences (MSA) generated in the MUSCLE stand. In order to assess similarities between accessions, a differential abundance analysis was performed to find the operational taxonomic units (OTUs) that have the most disparate abundances in the samples. The validity of the results was assessed by the Permanova analysis, which can be used to measure the effect size and the significance of beta diversity.

Results and discussion

As a result of the study of feed, it was found that the feed in the «Kuldybayev Dauletgali» farm was of average quality. Thus, mixed hay in terms of the content of crude protein and crude ash should be attributed to the 1st class, in terms of the content of crude fiber - to the 2nd class. However, in terms of dry matter content, hay is not cool. Corn silage in accordance with State

standart 55986-2014 is classified to the 1st class in terms of dry matter, crude protein and crude fiber, and to the 3rd class in terms of the concentration of crude ash in the dry matter of the feed. To carry out the scientific and economic experiment, two experimental groups of steers with 10 heads each were formed according to the principle of pairs of analogues [21] (Table 1).

Table 1 – Scheme of scientific and economic experience on steers

Group	Number of steers	Feeding conditions
Control group	10	Basic diet (BR)
An experienced group	10	Basic diet + flax grain

The difference in the diets of the experimental groups of animals was that the experimental group received flax seeds in the diet. At the same time, coarse feed in the structure of the diet of the control group occupied 22.0%. Juicy feeds accounted for 20.0%. The share of concentrated feed was 58.0%. There was a similar structure of rations in the experimental group. Thus, the share of roughage accounted for 22.5%, the share of succulent - 19.5%. The proportion of concentrates in the diet was 58.0%. Including flax seeds accounted for 9.2%. Hay consumption in the control group was 86.3%, silage - 96.47%, concentrates were eaten completely. In the experimental group, the feedability of hay was 86.43%, corn silage - 96.5%, concentrates were eaten completely. It follows from the data that the feed intake was the same in both groups. On average, animals of both groups consumed the same amount of dry matter (7.53 kg) per day. At the same time, energy consumption was higher in the experimental group by 5.13%, crude protein - by 2.0%, digestible protein - by 3.14%, and crude fat - by 56.6%, which is associated with the introduction of flax seeds into the diet in the amount of 500 g per head per day. The introduction of flax seeds in the diet of the experimental group had a positive effect on the productivity of animals. Thus, the absolute increase in weight in the experimental group was 124.5 ± 6.95 kg, and in the control group – 105.33 ± 2.16 kg. The excess was 19.17 kg or 18.2 relative percent ($P > 0.95$). The average daily increase in weight in the experimental group was higher and amounted to 1270.40 ± 70.94 g versus 1074.8 ± 22.01 g. The excess was 195.6 g or 18.2 relative percent ($P > 0.95$). This difference is due to the fact that the diets of the experimental group contained more energy, crude and digestible protein and fat. An increase in the average daily weight gain of the experimental group of steers had a positive effect on feed costs per 1 kg of weight gain. So, in the control group they amounted to 7.26 EFU (energy feed units), and in the experimental group – 6.45 EFU or less by 0.81 EFU, which was 12.6%. Along with this, the content of anaerobic bacteria and archaea in the feces of experimental animals was studied. The research results are presented in table 2.

Table 2 – The content of anaerobic bacteria and archaea in the faeces of experimental animals, %

Anaerobic bacteria	Group of steers		Probability level
	Control group	An experienced group	
Bacteria	98.67 ± 0.18	99.52 ± 0.03	$P > 0.95$
Archaea	0.02 ± 0.01	0.2 ± 0.01	$P > 0.999$

From the data in Table 2 it follows that the highest concentration of Archaea is found in the experimental group ($0.2 \pm 0.01\%$) compared to the control group of steers ($0.02 \pm 0.01\%$). The increase is 0.18 absolute percent or 10.0 times ($P > 0.999$). The analysis of the data obtained showed that the introduction of flax seeds into the diets of steers contributes to an increase in the number of anaerobic bacteria while increasing the concentration of archaea.

As a result of bioinformatic processing, generated OTU clusters were obtained, which are shown in Figure 1.

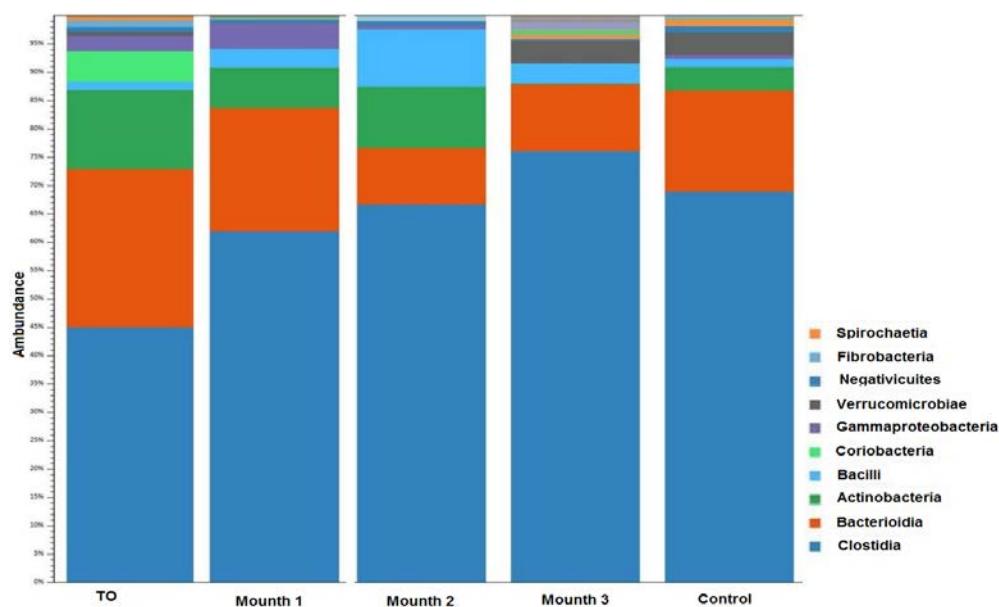


Figure 1 – Microbiota of steers at the class level in samples grouped by feeding flax seeds

Figure 1 shows an increase in the number of *Clostridia* from T0 to the 3rd month of feeding with flax seeds. Moreover, the number of *Bacteroides* decreases. These results were further evaluated by conducting a statistical analysis of the samples.

Alpha diversity was plotted on the diagram by grouping samples of flax seed introduction (Figure 2).

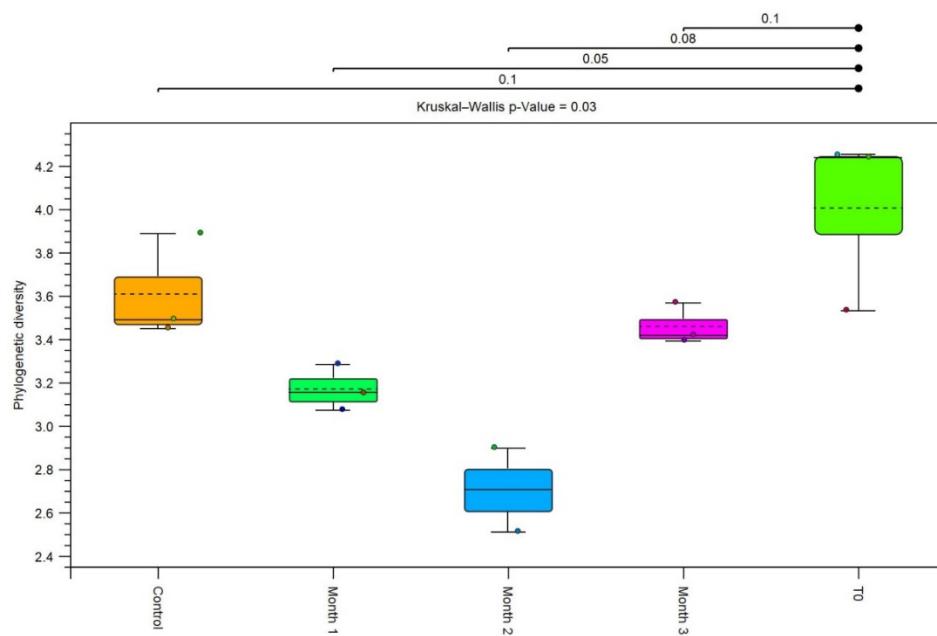


Figure 2 - Alpha diversity – rectangular diagram when feeding flax

The figure shows a significant separation of feeding groups ($p=0.03$).

Beta diversity analysis shows the analysis of basic coordinates (PCoA) at UniFrac distances (Figure 3).

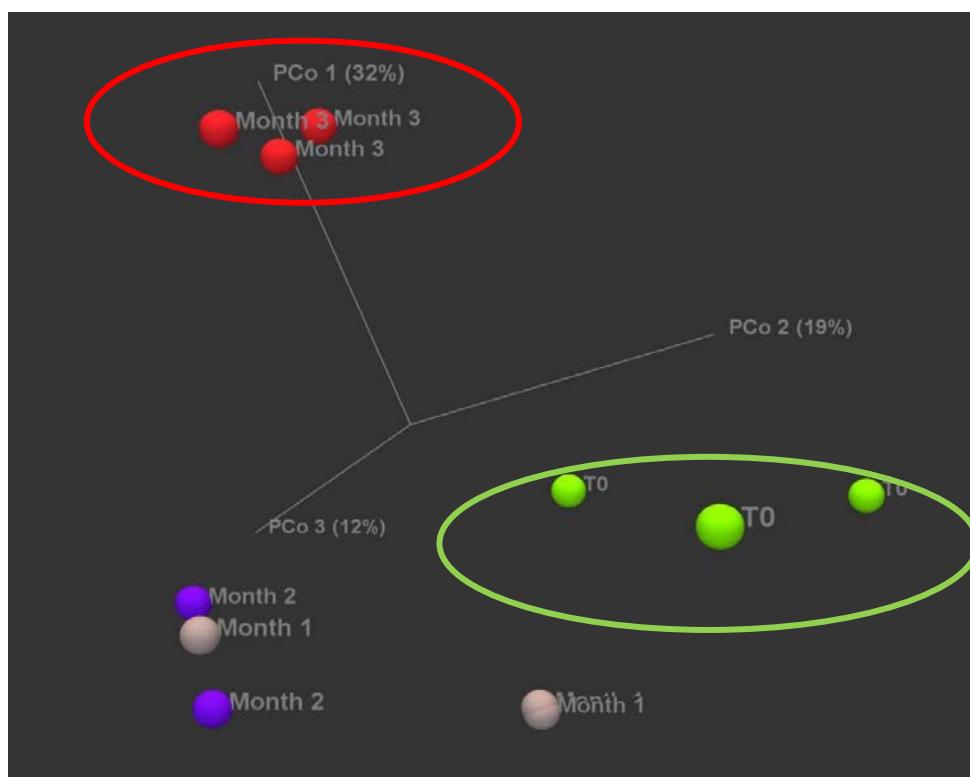


Figure 3 - Result of Beta diversity analysis — PCoA

In PCoA, the spheres of beta diversity in the graph are colored according to the metadata (feeding a flax seed diet). Interestingly, in this analysis, the microbiota at T0 and after 3 months flax seed feeding is clearly clustered into two different clusters. Animals over 1 and 2 months are also separated from the first groups, but tend to mix with each other. PCoA, involves a gradual change in the composition of the microbiota after feeding with flax.

Table 3 - Result of permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) analysis (Bry Curtis)

Groups			Pseudostatistics	p-value
			2.50489	0.00246
1	2	3	4	5
Group 1	Group 2	Pseudostatistics	p-value	P-value (Bonferroni)
Before	Month 2	0,78822	0,90000	1,00000
Before	Month 2	1,62391	0,10000	1,00000
Month 2	Month 3	2,18331	0,10000	1,00000
Before	Control	2,06822	0,10000	1,00000
Month 2	Control	4,79052	0,10000	1,00000
Month 3,	Control	11,24487	0,10000	1,00000
Before	Month1	1,03102	0,50000	1,00000
Month 2	Month1	0,78543	0,60000	1,00000
Month 3,	Month1	5,38830	0,10000	1,00000
Control	Month1	5,03025	0,10000	1,00000
PERMINOVA analysis (Jacquard)				
Variable	Groups		Pseudostatistics	p-value
Feeding	Before, Month 2, Month 3, Control, Month1		2,17219	0,00051

Table 3 continuation

1	2	3	4	5
Group 1	Group 2	Pseudostatistics	p-value	P-value (Bonferroni)
Before	Month 2	0,92241	0,80000	1,00000
Before	Month 2	1,98391	0,10000	1,00000
Month 2	Month 3	1,97859	0,10000	1,00000
Before	Control	1,69119	0,10000	1,00000
Month 2	Control	2,97312	0,10000	1,00000
Month 3	Control	6,45427	0,10000	1,00000
Before	Month 1	1,18759	0,20000	1,00000
Month 2	Month 1	0,85116	0,60000	1,00000
Month 3	Month 1	3,95923	0,10000	1,00000
Control	Month 1	3,20675	0,10000	1,00000

Methanogens. Bioinformatics analysis was carried out at 3 taxonomic levels: class, family and genus.

To check for a difference between the two groups, a differential analysis of the number of archaea was carried out (Table 4). The result of this analysis showed a 6-fold and 285-fold increase in the abundance of archaea of the classes *Methanobacteria* and *Methanomicrobia*, respectively, after the introduction of flax seeds into the diet for 3 months. These values are statistically confirmed, since the p - values are significantly lower than the threshold value ($p < 0.05$).

Table 4 - OTU Differential Population analysis at class level

Class name	Changing the fold	p-value
<i>Methanobacteria</i>	5,91	7,95E-3
<i>Methanomicrobia</i>	258,21	1,54E-3

The same approach was applied at the family and genus level (Figure 4), which confirms the increase in methanogens at 3 months compared to animals before feeding with flax seeds (T0). In particular, the methanogenic component of the microbiota of the gastrointestinal tract of cattle was identified as the families *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethylphilaceae* and the genera *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*.

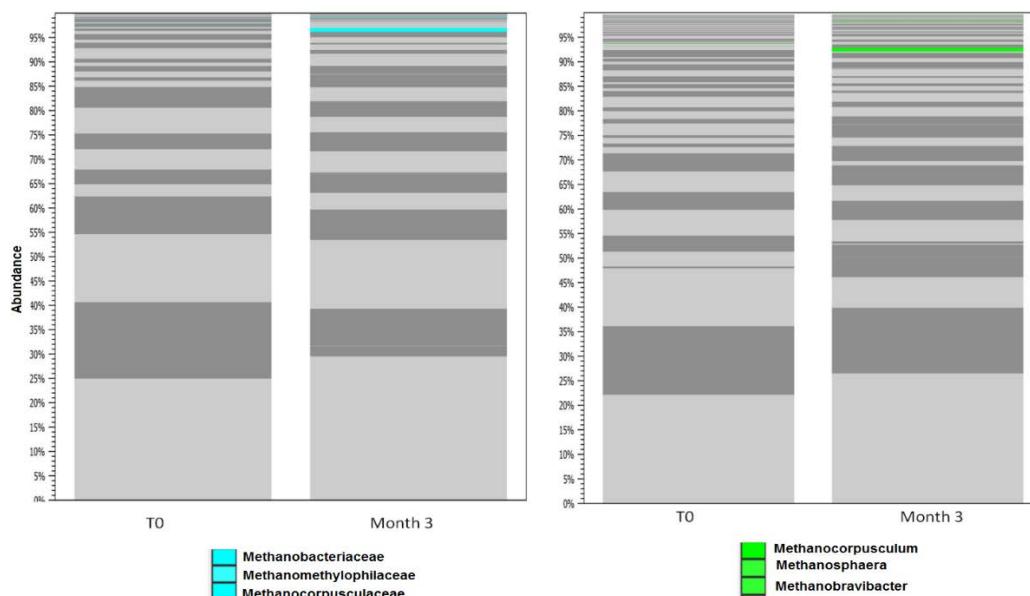


Figure 4 - Microbiota of steers at the family and genus levels of archaea in samples grouped by feeding on flax seeds. The methanogen component is colored in light blue and green colors

Similarly, differential abundance analysis was performed for families and genera of methanogens (Tables 5, 6). At the family level, a statistically significant variation in abundance at 3 months compared to animals before flax seed feeding (T0) was confirmed for *Methanocorpusculaceae* (255-fold increase) and *Mathanobacteriaceae* (6-fold increase). The results also showed a 13-fold increase in *Methanomethyphilaceae*.

Table 5 - OTU Differential abundance analysis at archaeal family level

Name	Changing the fold	p-value
<i>Methanocorpusculaceae</i>	254,81	1,36E-3
<i>Methanobacteriaceae</i>	6,05	0,02
<i>Methanomethyphilaceae</i>	12,72	0,07

Table 6 -OTU Differential abundance analysis at the level of archaea genera

Name	Changing the fold	p-value
<i>Methanocorpusulum</i>	166,92	0,08
<i>Methanospaera</i>	-1,51	0,52
<i>Methanobrevibacter</i>	1,00	0,98

A heat map (Figure 5) including all experimental groups (control, before flax seed feeding (T0), month 1, 2, 3) was created based on the table of operational taxonomic units (OTU) to keep all taxonomic information in the analysis.

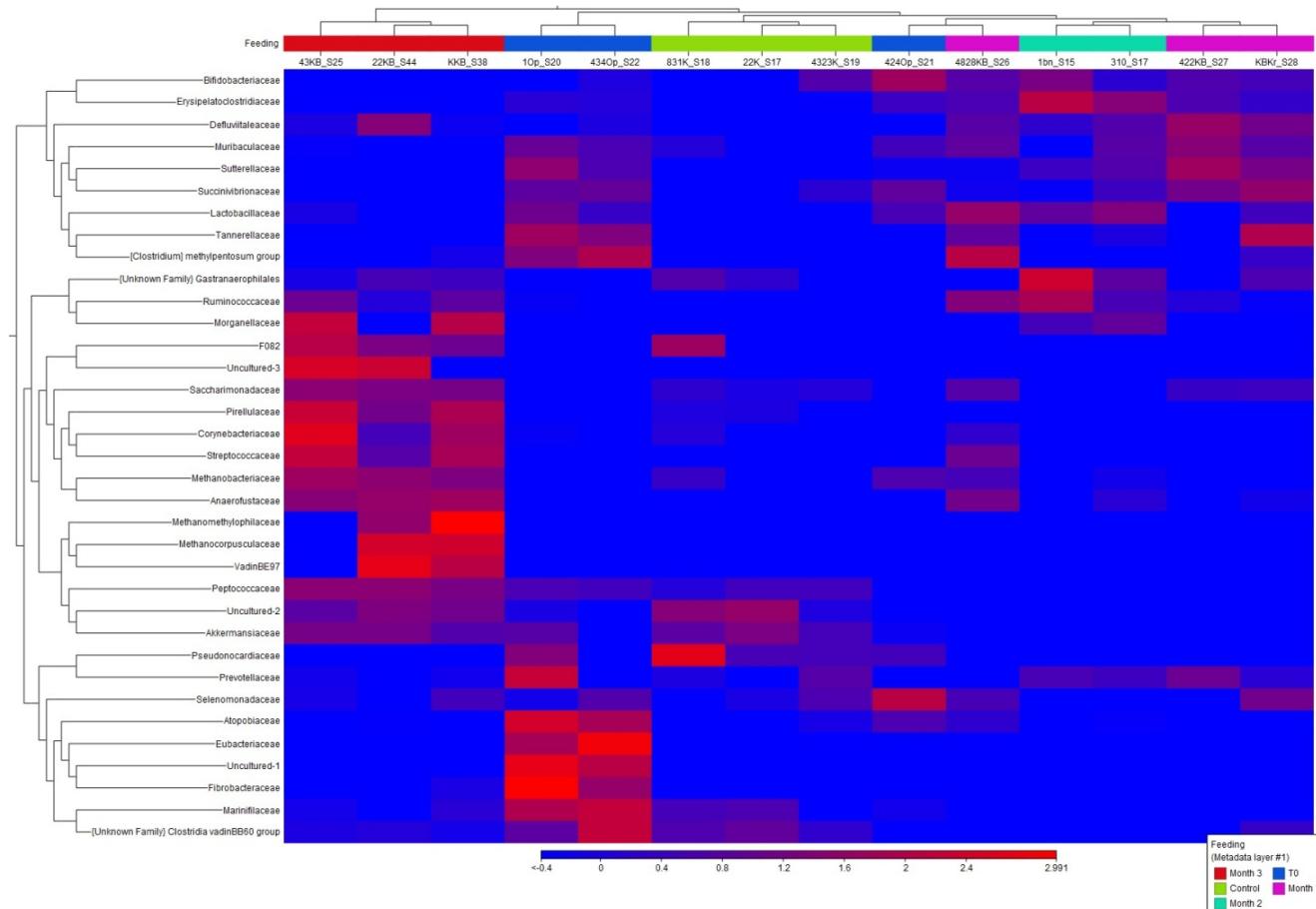


Figure 5 - Heat map of the OTU table for methanogens

This analysis is also very informative, as it shows that the increase in methanogens is insignificant up to 2 months after feeding with flax seeds, while the methanogenic component begins to increase as early as the third month.

Conclusion

In the experimental group of steers fed with flax seeds, there was a greater increase in weight compared to the control group. As a result of the metagenomic analysis, it was revealed that the introduction of flax seeds into the diets of steers contributes to an increase in the number of anaerobic bacteria and archaea (families *Methanobacteriaceae*, *Methanocorpusculaceae*, *Methanomethyphilaceae* and the genera *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*), which contributes to an increase in the productivity of steers and methane emission.

Funding

The work was supported financially by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant no. AP09259133).

References:

- 1 Korovy kak istochnik parnikovogo jeffekta? 2016. URL: <https://ru.euronews.com/methane-gas-threatening-to-slow-efforts-to-slow-climate-change>.
- 2 Upreti, DC, Subash Dhar, Dong Hongmin, Bruce A., Kimball, Amit Garg, Jigisha Upadhyay. *Technologies to mitigate the effects of climate change*. New Delhi. 2012. 141 P.
- 3 Luchka I.V., Bogdanov, G.O., Sologub L.I., Fedjakov R.O., Gerasimiv M.G. Vpliv vuglevodiv ta ih metabolitiv na metanoutvorennja i produkciju letkikh zhirnih kislot mikroorganizmami rubcja teljat. V sb.: *NTB Inctitutu biol. nauk UAAN*, K., 2004: 53-56.
- 4 Luchka I.V., Bogdanov G.O., Sologub L.I., Janovich V.G., Gerasimiv M.G. Utvorennja metanu v rubci velikogo rogatogo hudobi Zahidnoj Ukraini za riznogo tipu godivli. V sb.: *NTB Institutu biol. nauk UAAN*, K., 2005, 6:77-80.
- 5 Melikjan S.M., Luchka, I.V., Sologub L.I. Do renuljacija redukcij nitrativ i utvorennja metanu u rubci teljat. V sb.: *NTB Institutu biol. nauk UAAN*, 2006, 7:188-192.
- 6 Moss A.R. Methane production by ruminants — literature review: I. Dietary manipulation to reduce methane production. *Laboratory procedures for estimating methane potential of diets Nutrition Abstracts and Reviews*, 1994, 64:786-806.
- 7 Lana R.P., Russell J.B., Van Amburgh M.E. The role of pH in regulating methane and ammonia production. *Animal Science*, 1998, 76:2190-2196 (doi: 10.2527/1998.7682190x).
- 8 Fahey G.C., Berger L.L. Carbohydrate nutrition in ruminants. In: The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition. D.C. Church (ed.). V sb.: *Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey*, 1988: 269-297.
- 9 Demeyer D.I., De Graeve K. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1991, 22: 50-61.
- 10 Newbold C.J., Wallace R.J., Watt N.D., Richardson A.J. The effect of the novel ionophore tetravasin (ICI 139603) on ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 544-547 (doi.org/10.1128/aem.54.2.544-547.1988).
- 11 Czerkawski J.W., Christie W.W., Breckenridge G., Hunter, M.L. Changes in rumen metabolism of sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. *British Journal of Nutrition*, 1995, 34: 25-44 (doi: 10.1017/s0007114575000074).
- 12 Machmuller A., Ossowski D.A., Wanner M., Kreuzer M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 1998, 77:117-130 (doi: 10.1016/S0377-8401(97)00126-0).
- 13 Dohme F., Machmuller A., Estermann B.L., Wasserfalle, A., Kreuzer, M. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. *Letters in Applied Microbiology*, 1999, 2: 187-193 (doi: 10.3389/fmicb.2015.01313).
- 14 Frumholtz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *The Journal of Agricultural Science (Camb.)*, 1989, 113:169-172.

15 Mathieu F., Jouany J.P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus orizae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*, 1996, 36: 271-287 (doi: 10.1051/rnd:19960305).

16 Ishler,V., Heinrichs J., Varga G. *From feed to milk: understanding rumen function.* The Pennsylvania State University, 1996.

17 Morgavi D.P., Forano,E., Martin, C., Newbold C.J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 2021, 6 (5): 871 (doi: 10.1017/S175173111000546).

18 Kalashnikov A.P., Fisinin V.I., Shheglov V.V. *Normy i raciony kormlenija s.-h. zhivotnyh.* M., 2003. 305 P.

19 Jakovenko A.M., Antonenko T.I., Selionova M.I. *Biometricheskie metody analiza kachestvennyh i kolichestvennyh priznakov v zootehnii.* M., 2013. 91 P.

20 Shoukun J., Hongtao Zh., Hui Y., Arash A., Haitao Shi., Gibson A., Shengl L., Zhijun C., and Yajing W. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta rumen liquid and solid fractions in lactating in Holstein cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2017, 8:16 (doi: 10.1186/s40104-017-0142-z).

21 Ovsjanikov A.I. *Osnovy opytnogo dela v zhivotnovodstve.* M.,1976. 304 P.

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖЭНЕ 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.

ISSN 2304-585X



9 772304 585132



0 1