



ISSN 2304-585X
ISSN online 3005-222X
ИНДЕКС 76057

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

Tom/
Volume № Year

43 | 4 | 2023

LLP «Scientific and Production Center of Microbiology and Virology»
«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС
ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

MICROBIOLOGY AND VIROLOGY
МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

№ 4 (43)

ALMATY
2023

ISSN 2304-585 X
ISSN online 3005-222X
MICROBIOLOGY AND VIROLOGY
№ 4 (43)/2023

Scientific and practical journal
The journal is registered with the Committee of Information and Archives of the Ministry of Culture and Information of the Republic of Kazakhstan.
Certificate of registration No.12821-Z dated 06/12/2012

FOUNDER AND PUBLISHER

© LLP «Research and Production Center of Microbiology and Virology»

Editorial Board

Sadanov A.K. – Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician (Editor-in-Chief)
Baimakhanova B.B. – Candidate of Biological Sciences
Aitkeldiyeva S.A. – Doctor of Biological Sciences
Balgimbayeva A.S. – Candidate of Biological Sciences (Executive Editor)
Dr. Azliati Azizan (USA) – PhD
Berezin V.E. - Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the NAS RK
Bogoyavlenskiy A.P. – Doctor of Biological Sciences, Professor
Rapoport A. (Latvia) – Doctor of Biological Sciences, Professor
Golovleva L.A. (Russia) – Doctor of Biological Sciences, Professor
Kydymanov A.I. - Doctor of Veterinary Sciences
Magay E.B. (Uzbekistan) – candidate of biological sciences
Muradov P.Z. (Azerbaijan) - Doctor of Biological Sciences, Professor, Member of the NAS of Azerbaijan
Nauanova A.P. – Doctor of Biological Sciences, Professor
Ratnikova I.A. – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor
Savitskaya I.S. – Doctor of Biological Sciences, Professor
Dr. Sasan Fereidouni (Austria) – DVM, PhD
Kuzmetov A.R. (Uzbekistan) – Doctor of Biological Sciences, Professor
Saubenova M.G. – Doctor of Biological Sciences, Professor
Smirnova I.E. - Doctor of Biological Sciences

EDITORIAL OFFICE ADDRESS:

050010, 105 Bogenbai Batyr str., Almaty
Telephone:+7(727) 291-84-97, 291-97-36
Website: <http://imv-journal.kz>
Subscription index – 76057

PRINT

LLP «Print Market.kz»
Address: 125 Kazybek bi str., Almaty
telephone: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68
Distribution area –
The Republic of Kazakhstan
Frequency – 4 issues per year
Circulation of 500 copies

ISSN 2304-585 X
ISSN online 3005-222X
МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ
№ 4 (43)/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

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
Рапопорт А. (Латвия) – доктор биологических наук, профессор
Головлева Л.А. (Россия) – доктор биологических наук, профессор
Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук
Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук
Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана
Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор
Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент
Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор
Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD
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. Бogenбай батыра, 105
Телефон:+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
Телефон: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68
Территория распространения –
Республика Казахстан
Периодичность – 4 номера в год
Тираж 500 экземпляров

CONTENTS

REVIEW RESEARCH PAPERS

- A.A. Amangeldi, Y.A. Oleinikova
Application of lactic acid bacteria for obtaining sourdough in bread production.....6
- N.A. Meirbekov, A.B. Ibraimov, Y.A. Syrgabek, S.S. Yegemova, S.E. Batyrbekova, S. Zh. Kazybayeva
Pathogenic microorganisms of grapes: mechanism of infection and methods of protection.....16
- A.M. Isimov, G.B. Admanova, A.T. Sarzhigitova, N.K. Kemalova, B. Bakytzhankyzy
Python as a tool for genome-scale metabolic model reconstruction and analysis.....32
- M.G. Saubenova, A. Rapoport, Y.A. Oleinikova, S.V. Maksimovich, Zh.N. Ermekbay
Efficiency of feeder yeast and their derivatives in animal husbandry.....63
- A.T. Abishev, M.Kh. Dzhusupgalieva, M.K. Gabasova, A.Zh. Zhumabekova, S.S. Yakushenko
Features of genomic and phenotypic variability of *Neisseria gonorrhoeae* sensitivity to antimicrobial drugs.....80
- S.T. Urazayeva, T. Begalin, V.S. Toigombaeva, A.B. Urazayeva, A.A. Amanshieva, G.Zh. Nurmaganbetova, Sh.M. Nurmukhamedova, N.E. Yerbolat, D.A. Aidyngaliyeva
The problem of vaccination rejections and ways of solution.....110
- A.K. Mussayeva, S.N. Abdreshov, N.N. Yegorova, A.N. Yeshmukhanbet, M.A. Yessenova, N. Gorchakov, G.A. Demchenko
Characteristics of bacterial microflora in rats with massive infection of the abdominal cavity.....183
- A.A. Myrzakhmet, T.D. Mukasheva, T.I. Davlyatshin, B.M. Khairullin, A.M. Namet, G.Zh. Sarsenbayeva, D.A. Inkarbekov, S.M. Barmak, T.T. Davlyatshin, A.A. Sizov, G.S. Aubakirova, M.B. Orynbayev
Development of a technology for the production of reagents for the detection of antibodies to foot and mouth disease virus type A by elisa method.....197
- Zh.A. Orynbayeva, Z.B. Tungushbaeva, N.B. Moldagulova, E. Nagyzbekkyzy, N.V. Rudakov
Comparative activity of lactic acid bacteria to various antibiotics and microorganisms.....217
- N.N. Salybekova, A.K. Apushev, B.Yu. Yusupov, G. Kahraman, B.B. Toyzhigitova, A.Sh. Mambaeva
Phytopathogenic fungi of the Genus *penicillium sp.* on tulips234
- B.B. Makhatayeva, P.S. Ualieva, G.Zh. Abdieva, E.K. Ongarbayev, A.S. Nurmaganbetova
Study of the destructive activity of biosorbent based on oil-oxidizing bacteria.....252

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

- A.K. Akhmetzhanova, G.I. Baigazieva, A.K. Kekibaeva, L. Hryvna
New yeast strain for beer production.....126
- A.G. Nogaibaeva, K. Makhmaden, Zh.K. Tulemisova, Z.A. Kozhakhmetova, G.T. Kassenova, K.A. Myrzabek
Influence of berry extracts on the technological and functional properties of probiotic yogurt based on lactic acid bacteria.....140
- R.S. Sattarova, V.M. Stochkov, K.E. Boranbaeva, N.A.Zamanbekov, F. Bakiev, K.M. Shynybaev, M.S. Ospanova, K. Sman, G.N. Spiridonov
Comparative diagnostics for infectious and invasive keratoconjunctivas of cattle.....156
- I.I. Temreshev, B.K. Kopzhassarov, Z.B. Beknazarova, A.M. Sarbassova, A.K. Sadanov, E.T. Ismailova, A.E. Molzhigitova, R.V. Yakovlev
Red bud borer *Resseliella oculiperda* (Rübsaamen, 1893) (Diptera, Cecidomyiidae) – a new vector of fire blight (*Erwinia amylovora*) of fruit crops in Kazakhstan.....171

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

- А.А. Амангелді, Е.А. Олейникова
Применение молочнокислых бактерий для получения заквасок в производстве хлеба.....11
- Н.А. Мейрбеков, А.Б. Ибраимов, Е.А. Сыргабек, С.С. Егемова, С.Е. Батырбекова, С.Ж. Казыбаева
Патогенные микроорганизмы винограда: механизм заражения и методы защиты.....24
- А.М. Исимов, Г.Б. Адманова, Н.К. Кемалова, А.Т. Саржігітова, Б. Бакыгжанқызы
Python как инструмент для реконструкции и анализа метаболической модели в масштабе генома.....46
- М.Г. Саубенова, А. Рапопорт, Е.А. Олейникова, С.В. Максимович, Ж.Н. Ермекбай
Эффективность применения кормовых дрожжей и их производных в животноводстве.....71
- А.Т. Абишев, М.Х. Джусупгалиева, М.К. Габасова, А.Ж. Жұмабекова, С.С. Якушенко
Особенности геномной и фенотипической изменчивости чувствительности *Neisseria gonorrhoeae* к антимикробным препаратам.....93
- С.Т. Уразаева, Т. Бегалин, В.С. Тойгомбаева, А.Б. Уразаева, А.А. Аманшиева, Г.Ж. Нұрмағанбетова, Ш.М. Нурмухамедова, Н.Е. Ерболат, Д.А. Айдынғалиева
Проблема отказов от вакцинации и пути решения.....118
- А.К. Мусаева, С.Н. Абдрешов, Н.Н. Егорова, А.Н. Ешмуханбет, М.А. Есенова, В.Н. Горчаков, Г.А. Демченко
Характеристика бактериальной микрофлоры у крыс при массивном инфицировании брюшной полости.....190
- А.А. Мырзахмет, Т.Д. Мукашева, Т.И. Давлятшин, Б.М. Хайруллин, А.М. Намет, Г.Ж. Сарсенбаева, Д.А. Инкарбеков, С.М. Бармак, Т.Т. Давлятшин, А.А. Сизов, Г.С. Аубакирова, М.Б. Орынбаев
Разработка технологии изготовления реагентов для выявления антител к вирусу ящура типа А методом иммуноферментного анализа.....206
- Ж.А. Орынбаева, З.Б. Тунгушбаева, Н.Б. Молдагулова, Э. Нагызбекқызы, Н.В. Рудаков
Сравнительная активность молочнокислых бактерий к различным антибиотикам и микроорганизмам.....224
- Н.Н. Салыбекова, А.К. Апушев, Б.Ю. Юсупов, Г. Кахраман, Б.Б. Тойжигитова, А.Ш. Мамбаева
Фитопатогенные грибы рода *Penicillium sp.* на тюльпанах243
- Б.Б. Махатаева, П.С. Уалиева, Г.Ж. Абдиева, Е.К. Онгарбаев, А.С. Нурмаганбетова
Исследование деструктивной активности биосорбента на основе нефтеокисляющих бактерий.....260

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.К. Ахметжанова, Г.И. Байгазиева, А.К. Кекибаева, Л. Гривна
Новый штамм дрожжей для производства пива.....132
- А.Г. Ногайбаева, К. Махмаден, Ж.К. Тулемисова, З.А. Кожаметова, Г.Т. Касенова, К.А. Мырзабек
Влияние ягодных экстрактов на процесс ферментации, сенсорные показатели и количество жизнеспособных бактериальных клеток молочнокислых бактерий пробиотического йогурта.....148
- Р.С. Саттарова, В.М. Строчков, К.Е. Боранбаева, Н.А. Заманбеков, Ф.А. Бакиева, К.М. Шыныбаев, М.С. Оспанова, К. Сман, Г.Н. Спиридонов
Сравнительная диагностика при инфекционном и инвазионном кератоконъюнктивитах крупного рогатого скота.....163
- И.И. Темрешев, Б.К. Копжасаров, З.Б. Бекназарова, А.М. Сарбасова, А.К. Саданов, Э.Т. Исмаилова, А.Е. Молжигитова, Р.В. Яковлев
Окулировочная галлица *Resseliella oculiperda* (Rübsaamen, 1893) (Diptera, Cecidomyiidae) – новый переносчик возбудителя бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) плодовых в Казахстане.....177

МАЗМУНЫ

ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

А.А. Амангелді, Е.А. Олейникова
Нан өндірісінде сүтқышқылды бактерияларын ашытқы алу үшін қолдану.....10

Н.А. Мейрбеков, А.Б. Ибраимов, Е.А. Сырғабек, С.С. Егемова, С.Е. Батырбекова, С.Ж. Қазыбаева
Жүзімнің патогенді микроорганиздері: инфекция механизмі және қорғау әдістері.....23

А.М. Исимов, Г.Б. Адманова, Н.К. Кемалова, А.Т. Саржигитова, Б. Бақытжанқызы
Python геномдық масштабтағы метаболикалық модельді қайта құру және талдау құралы ретінде.....46

М.Г. Саубенова, А. Рапопорт, Е.А. Олейникова, С.В. Максимович, Ж.Н. Ермекбай
Мал шаруашылығында жемшөп ашытқысын және олардың туындыларын қолданудың тиімділігі.....70

А.Т. Әбішев, М.Х. Жүсіпғалиева, М.К. Ғабасова, А.Ж. Жұмабекова, С.С. Якушенко
Neisseria gonorrhoeae-н микробқа қарсы сезімталдығының геномдық және фенотиптік өзгергіштігінің ерекшеліктері.....94

С.Т. Уразаева, Т. Бегалин, В.С. Тойгомбаева, А.Б. Уразаева, А.А. Аманшиева, Г.Ж. Нұрмағанбетова, Ш.М. Нурмухамедова, Н.Е. Ерболат, Д.А. Айдынғалиева
Вакцинациядан бас тарту мәселесі және оны шешу жолдары.....117

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

А.К. Ахметжанова, Г.И. Байғазиева, А.К. Кекибаева, Л. Гривна
Сыра өндіруге арналған жаңа ашытқы штаммы.....133

А.Г. Ногайбаева, К. Махмаден, Ж.К. Тулемисова, З.А. Кожаметова, Г.Т. Касенова, К.А. Мырзабек
Жидек сығындыларының пробиотикалық йогурттың ашу процесіне, сенсорлық параметрлеріне және сүтқышқылды бактериялардың өміршең бактериялық жасушалар санына әсері.....147

Р.С. Саттарова, В.М. Строчков, К.Е. Боранбаева, Н.А.Заманбеков, Ф.А. Бакиева, К.М. Шыныбаев, М.С. Оспанова, К. Сман, Г.Н. Спиридонов
Ірі кара малдың індетті және инвазивті кератоконъюнктивитін салыстырмалы балау.....163

І.И. Темрешев, Б.К. Копжасаров, З.Б. Бекназарова, А.М. Сарбасова, А.К. Саданов, Э.Т. Исмаилова, А.Е.Молжигитова, Р.В. Яковлев
Resseliella oculiperda (Rübsaamen, 1893) (Diptera, Cecidomyiidae) бүршік галлицасы – Қазақстандағы жеміс дақылдарының бактериялық күйік (*Erwinia amylovora*) қоздырғышының жаңа тасымалдаушысы.....176

А.К. Мусаева, С.Н. Әбдірешов, Н.Н. Егорова, А.Н. Ешмуханбет, М.А. Есенова, В.Н. Горчаков, Г.А. Демченко
Құрсақ қуысында инфекциясы бар егеуқұйрықтардың бактериялық микрофлорасына сипаттама.....189

А.А. Мырзахмет, Т.Д. Мукашева, Т.И. Давлятшин, Б.М. Хайруллин, А.М. Намет, Г.Ж. Сарсенбаева, Д.А. Инкарбеков, С.М. Бармак, Т.Т. Давлятшин, А.А. Сизов, Г.С. Әубакірова, М.Б. Орынбаев
Иммуноферменттік талдау әдісі бойынша А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтауға арналған реагенттерді өндіру технологиясын әзірлеу.....207

Ж.А. Орынбаева, З.Б. Тұңғышбаева, Н.Б. Молдагулова, Э. Нағызбекқызы, Н.В. Рудаков
Сүтқышқылды бактериялардың әртүрлі антибиотиктер мен микроорганизмдерге салыстырмалы белсенділіктері.....225

Н.Н. Салыбекова, А.К. Апушев, Б.Ю. Юсупов, Г. Кахраман, Б.Б. Тойжигитова, А.Ш. Мамбаева
Қызғалдақтардағы *Penicillium sp.* тұқымдасының фитопатогенді саңырауқұлақтары.....242

Б.Б. Махатаева, П.С. Уалиева, Г.Ж. Абдиева, Е.К. Онгарбаев, А.С. Нұрмағанбетова
Мұнайототықтырушы бактериялар негізіндегі биосорбенттің деструктивті белсенділігін зерттеу260

=====

REVIEW RESEARCH PAPERS

=====

IRSTI: 34.27.39, 62.09.39, 65.33.29

A.A. AMANGELDI*, Y.A. OLENIKOVA

Research and Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: almashka91@mail.ru

APPLICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR OBTAINING SOURDOUGH IN BREAD PRODUCTION**doi:10.53729/MV-AS.2023.04.01****Abstract**

Lactic acid bacteria have become widespread due to their active use in sourdoughs for bread production. The data presented in the review highlight the fact that sourdough is an important component of the primary microflora of bakery products. The choice of lactic acid bacteria directly depends not only on their effectiveness in combating the causative agent of potato bread disease, but also on other properties. Parameters such as sensory properties, acid accumulation, and antifungal activity are also the main criteria when choosing starter microorganisms.

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

Bread is one of the oldest functional foods, the effects of which on health have been studied in many scientific works [1].

For centuries, bread has been the staple food of the world's population. It is a baked product made from dough that has gone through a process of kneading, shaping, fermenting and baking. The quality of bread made from different types of flour, its safety from a microbiological point of view and nutritional value are the main problems of the food industry [2,3].

Fungal contamination during bread production is a cause for concern as it can reduce the shelf life of the product, leading to economic losses and consumer dissatisfaction. Fungal spores arise mainly from raw materials and the air of enterprises. The main alternative to combat them is the use of preservatives; however, this method may lose effectiveness due to the resistance of some fungal strains to approved preservatives. In contrast, the use of commercial disinfectants to reduce environmental pollution, and more recently biopreservation, may provide an alternative to control the microbial load in baked goods, slowing down fungal spoilage and therefore extending the shelf life of bread [4].

To solve all the above-mentioned problems, the selection and use of new strains of lactic acid bacteria and yeast with the desired biotechnological properties is a promising area of research, since it allows optimizing the breeding and production cycles of sourdough preparation, as well as ensuring stable quality of products and their resistance to microbial spoilage [5].

The quality of some yeast sourdough baked goods is not always consistent unless a well-diluted sourdough starter is used to ferment the dough. Among the different types of starter cultures used, traditional sourdough has attracted the interest of researchers, mainly due to its high microbial diversity, especially regarding lactic acid bacteria [6]. The microbial diversity of sourdough is mainly determined by the following factors:

1. sourdough is obtained as a result of spontaneous multi-stage fermentation;
2. sourdough is grown using flour, the nutrient content of which may vary between batches and cultures, and which is naturally contaminated with microorganisms;

3. sourdough corresponds to special technological parameters that vary depending on historical and cultural conditions and the type of baked goods.

In the population dynamics leading from flour to mature sourdough, lactic acid bacteria (some species of *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.* and *Weissella sp.*) and yeasts (mainly *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida sp.*) displace other microbial groups contaminating the flour and interact with each other at different levels [7]. Environmental parameters that qualitatively and quantitatively influence the dominant microbiota of a sourdough can be divided into specific process parameters (e.g., percentage of sourdough used as inoculum, fermentation time, and temperature) and parameters that are not fully controlled (e.g., chemical, enzymatic and microbiological composition of flour). Although there are reports that some sourdough cultures contain a stable dominant microbiota, the stability of the sourdough ecosystem over time remains controversial. Indeed, the maintenance of associations of species and strains typical of this sourdough may be hampered by several factors: metabolic adaptation to the stressful conditions of the sourdough, nutritional and antagonistic interactions between microorganisms, internal resistance of microorganisms and the existence of a stable domestic microbiota [8].

Lactic acid bacteria play an important role in food, agricultural and clinical practice. There is a general consensus that there is a main group consisting of four genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Streptococcus*. Recent taxonomic revisions have proposed several new genera, and the remaining group now includes the following: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella*. Their importance stems mainly from their safe metabolic activity when grown in food products, using available sugar to produce organic acids and other metabolites. Their frequent occurrence in foods along with their long-term use contributes to their natural recognition as GRAS (generally recognized as safe) for human consumption [9].

Lactic acid bacteria have a wide range of benefits, including not only making bread safer, more valuable, and more sustainable but also solving problems associated with improving product quality. Table 1 shows the most commonly used types and main properties of lactic acid bacteria in the baking industry.

Table 1 – Main species of lactic acid bacteria in bread production

№	Lactic acid bacteria	Properties	Ссылка
1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Increase Acid Resistance	[10]
2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Active antagonist of <i>Bacillus subtilis</i> , the causative agent of potato bread disease	[11]
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	The main role in the process of acid accumulation in the production of wheat and rye starter	[12]
4	<i>Lactocaseibacillus casei</i> , <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> and <i>Levilactobacillus brevis</i>	Improving the taste and aroma of the product, against moulding, bread disease potato disease	[13]
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> and <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Increase shelf life by lowering pH, improves bread texture	[14]
6	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> and <i>Lentilactobacillus diolivorans</i>	Increased antifungal properties of bread	[15]

Sourdough production is an ancient method of fermenting cereal flour to make baked goods. Flour fermentation processes for the production of sourdough are usually carried out by heterogeneous communities of lactic acid bacteria and yeasts [16].

The making of sourdough bread is considered a typical example of an old and traditional fermentation process. This is the first method of producing bread using natural sourdough, dating back thousands of years, which unknowingly used endogenous lactic acid bacteria and/or yeast, since these microorganisms were present in the raw material until commercial yeast became commercially available. First brewer's yeast, starting in the Middle Ages, and then baker's yeast,

starting in the 19th century was used for sourdough. To produce sourdough, a mixture of grain flour (fractions) and water is prepared, which either ferments spontaneously and then undergoes a reverse process in the case of traditional sourdoughs, or is fermented in one stage over several hours for several days in the case of industrial sourdoughs. The resulting starter cultures are used as functional bread dough ingredients for the production of yeast-leavened bread or to replace baker's yeast in the production of traditional sourdough bread. Currently, the use of sourdough starters as a source of flavor, nutrition and health ingredients in bread baking is becoming increasingly popular [17].

According to the results of recent studies to improve the quality of bread and extend the shelf life of the finished product, lactic acid bacteria not only meet these requirements, but also significantly improve the viscoelasticity, texture characteristics, extensibility and water-holding capacity of the sourdough, and enrich the aroma with volatile compounds [18,19].

In general, in many studies, strains of lactic acid bacteria have demonstrated antibacterial activity against bacteria that cause bread spoilage, making them potential biocontrol agents in bread production [20-22].

The goal of many works is to identify the most effective way to combat the causative agent of potato bread disease. Based on the research results, it can be concluded that the addition of a mixture of organic acids and LAB to the product recipe contributed to the improvement of the physicochemical parameters of the products, while the development time of potato disease was delayed by up to 120 hours [23].

To increase the microbiological stability of gluten-free bakery products, the St. Petersburg Branch of the Federal State Scientific Institution Research Institute of Chemical Chemistry has studied the possibility of using a fermented semi-finished product containing pure cultures of lactic acid bacteria in their production. The selection of lactic acid bacteria strains from the collection is based on the study of their antagonistic activity against pathogens of potato bread disease [24].

Lactic acid bacteria produce antibacterial substances, which include bacteriocins, fungicidal substances, organic acids, hydrogen peroxide, pyrrolidone-5-carboxylic acid, diacetyl and reuterin. The antagonistic activity of LAB may be due not only to the presence of bacteriocins, but also to the production of organic acids (lactic, acetic) and low pH. Antagonistic activity depends on the species and strain characteristics of the producer strain and the indicator strain. The use of sourdoughs with targeted cultivation of LAB, producing bacteriocins and other antimicrobial substances, can be an effective biological way to combat microbial spoilage of bread and a good alternative to chemical preservatives [25].

Borowska et al investigated the use of homofermentative lactic acid bacteria to produce low FODMAP (fermentable oligo-di-monosaccharides and polyols) whole grain breads that are recommended for people with irritable bowel syndrome. Three homofermentative strains, *Lactiplantibacillus plantarum* FST1.7, *Lacticaseibacillus paracasei* R3 and *Pediococcus pentosaceus* RYE106, were selected for sourdough fermentation, resulting in low FODMAP breads [26].

Conclusion

As can be seen from the presented review, there are many species of lactic acid bacteria used to produce bread starters. In addition to their use as pure technological strains in the food industry, given the antimicrobial, antifungal and microbiome-modulating properties of these microorganisms, they can be used as important components in improving the biological value of food products.

Funding

This research was funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP19674612 Development of native mixed starter cultures to ensure the quality and safety of bread).

References:

- 1 Abebaw G., Duguma S. Review On: Progress In Wheat Bread Improvement: Emphasis on Ingredient Functionality. *Auctores Publishing LLC*. 2021, 4, 01–03. (<https://doi.org/10.31579/2637-8914/048>)
- 2 Randelović D., Bogdanović S., Zlatković I. Nutritional value and microbiological quality of various types of bread. *1st International Symposium On Biotechnology*, 2023, 381-386. (DOI: 10.46793/SBT28.381R)
- 3 Irene M. C. Pateras. Bread spoilage and staling. *Technology of Breadmaking*, 2002, 240-261. (https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2199-0_10)
- 4 Garcia M.V., Bernardi A.O., Copetti M.V. The fungal problem in bread production: insights of causes, consequences, and control methods. *The fungal problem in bread production: insights of causes, consequences, and control methods*. 2019, 29: 1-6. (<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>)
- 5 Lokachuk M.N., Kuznecova L.I., Savkina O.A., Pavlovskaya E.N., Parahina O.I., Barsukova T.T. Issledovanie vliyaniya novykh shtammov molochnokislykh bakterij na kachestvo gustoj rzhanoy zakvaski i hleba. *Hlebopechenie rossii*, 2019, 4: 32-35. (doi: 10.37443/2073-3569-2019-1-4-32-35)
- 6 Bender D., Fraberger V., Szepasvári P. Effects of selected lactobacilli on the functional properties and stability of gluten-free sourdough bread. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244: 1037–1046. (<https://doi.org/10.1007/s00217-017-3020-1>)
- 7 Novotni D., Ganzle M., Rocha J.M. Composition and activity of microbiota in sourdough and their effect on bread quality and safety. *Trends in Wheat and Bread Making*, 2020, 129-172. (DOI:10.1016/B978-0-12-821048-2.00005-2)
- 8 Calvert MD, Madden AA, Nichols LM, Haddad NM, Lahne J, Dunn RR, McKenney EA. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ Publishing*, 2021. (DOI: 10.7717/peerj.11389)
- 9 Calvert MD, Madden AA, Nichols LM, Haddad NM, Lahne J, Dunn RR, McKenney EA. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ Publishing*, 2021.
- 10 Bartkiene E., Vizbickiene D., Bartkevics V., Pugajeva I., Krungleviciute V., Zadeike D., Zavistanaviciute P., Juodeikiene G. Application of *Pediococcus acidilactici* LUHS29 immobilized in apple pomace matrix for high value wheat-barley sourdough bread. *LWT-Food Sci. Technol.*, 2017,83: 157–164. (DOI:10.1016/j.lwt.2017.05.010)
- 11 Magazhanov ZH.M., CHumakova A.V., Dudikova G.N., Suprun S.S. SHtamm bakterij *Lactobacillus fermentum* 129 – aktivnyj antagonist B.subtilis – vzbuditelya kartofel'noj bolezni hleba. KazNIIPPP. Zayavl. 13.10.2010. Opubl. 15.12.2011. Byul. № 12.
- 12 Lukin, A. A., Merenkova S.P., Ligostaev D.G. Razrabotka tekhnologii bezdrozhzhevogo hleba. Molodoy uchenyj, *Tekhnicheskie nauki*, 2016, 11 (115): 411-414. URL: (<https://moluch.ru/archive/115/30367/>)
- 13 Shabanova E.M., Volkova O.V., Nevskaya E.V. Razrabotka i primenenie biozakvaski s vysokimi antagonisticheskimi svojstvami dlya preduprezhdeniya kartofel'noj bolezni i plesneveniya hleba. *Innovacionnye processy v pishchevyh tekhnologiyah: nauka i praktika* - 2019. (<https://vniiz.org/science/publication/article-383/conf90-article-74>)
- 14 Mikroflora zakvaski. *Vse o hlebe na zakvaske i zdorovom pitanii*. (<http://sshleb.info/mikroflora-zakvaski/>)
- 15 Zhang C., Brandt M.J., Schwab C., Gänzle M.G. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiol.* 2010, 27(3):390-5. (doi: 10.1016/j.fm.2009.11.019)
- 16 Tolu V., Fraumene C., Carboni A., Loddo A., Sanna M., Fois S., Roggio T., Catzeddu P. Dynamics of Microbiota in Three Backslopped Liquid Sourdoughs That Were Triggered with the Same Starter Strains. *Fermentation*. 2022; 8(10):571. (<https://doi.org/10.3390/fermentation8100571>)
- 17 De Vuyst L., Comasio A., Kerrebroeck S.V. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023,63(15): 2447-2479. (doi: 10.1080/10408398.2021.1976100)
- 18 Sun L., Li X., Zhang Y., Yang W., Ma G., Ma N., Hu Q., Pei F. A novel lactic acid bacterium for improving the quality and shelf life of whole wheat bread. *Food Control*, 2020,109. (<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106914>)

19 SARAÇ E., ÇON A. Preventing of bread mould spoilage and reducing the use of calcium propionate in bread by using antifungal lactic acid bacteria. *European Food Science and Engineering*. 2022, 3:11-17. (<https://doi.org/10.55147/efse.1117033>)

20 Iosca G., Fugaban J.I., Özmerih S., Wätjen A.P., Kaas R.S., Hà Q., Shetty R., Pulvirenti A., De Vero L., Bang-Berthelsen C.H. Exploring the Inhibitory Activity of Selected Lactic Acid Bacteria against Bread Spoilage Agents. *Fermentation*. 2023, 9(3):290. (<https://doi.org/10.3390/fermentation9030290>)

21 Bungenstock L., Abdulmawjood A., Reich F. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS One*. 2020, 15(3):e0230345. (doi: 10.1371/journal.pone.0230345)

22 Gregirchak N., Stabnikova O., Stabnikov V. Application of Lactic Acid Bacteria for Coating of Wheat Bread to Protect it from Microbial Spoilage. *Plant Foods Hum Nutr*. 2020,75(2):223-229. (doi: 10.1007/s11130-020-00803-5)

23 Nevskaya E.V., Kozionov A.V., Nosova M.V. Issledovanie vliyaniya nekotoryh konservantov i molochnokislyh bakterij na vozбудitelej kartofel'noj bolezni hleba. *Veles*. 2016, 7-1: 50-53. (<https://www.elibrary.ru/wmlytl>)

24 Dubrovskaya N.O., Kuznecova L.I., Parahina O.I. Sposob povysheniya mikrobiologicheskoy ustojchivosti bezglyutenovogo hleba. *Hlebopechenie rossii*. 2017, 4: 22-24. (<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=30318658>)

25 Lokachuk M.N., Pavlovskaya E.N., Savkina O.A. Antagonisticheskaya aktivnost' molochnokislyh bakterij kak sposob podavleniya mikrobnoy porchi hleba. *Hleboprodukty*. 2020, 6:45-48. (<https://elibrary.ru/item.asp?id=43777576>)

26 Borowska M., Ispiryan L., Neylon E., Sahin A.W., Murphy C.P., Zannini E., Arendt E.K., Coffey A. Screening and Application of Novel Homofermentative Lactic Acid Bacteria Results in Low-FODMAP Whole-Wheat Bread. *Fermentation*. 2023; 9(4):336. (<https://doi.org/10.3390/fermentation9040336>)

А.А. АМАНГЕЛДІ*, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА

Микробиология және вирусология ғылыми - өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

*e-mail: almashka91@mail.ru

НАН ӨНДІРІСІНДЕ СҮТҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРЫН АШЫТҚЫ АЛУ ҮШІН ҚОЛДАНУ

Түйін

Сүтқышқылды бактериялары нанға арналған ашытқыларды алудағы белсенді қолданылуының арқасында кең таралды. Шолуда ұсынылған деректер нан ашытқысы нан өнімдерінің бастапқы микрофлорасына кіретін маңызды компонент екенін көрсетеді. Сүтқышқылды бактерияларын таңдау олардың нанның картоп ауруының қоздырғышымен күресудегі тиімділігіне ғана емес, сонымен қатар басқа қасиеттеріне де тікелей байланысты. Органолептика, қышқылдың жиналуы және саңырауқұлақтарға қарсы белсенділік сияқты көрсеткіштер ашытқыға арналған микроорганизмдерді таңдаудағы негізгі талаптары болып табылады.

Кілтгі сөздер: сүтқышқылды бактериялар, нан ашытқысы, сапа, қауіпсіздік.

MPHTI: 34.27.39, 62.09.39, 65.33.29

А.А. АМАНГЕЛДІ*, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА

Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

*e-mail: almashka91@mail.ru

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЗАКВАСОК В ПРОИЗВОДСТВЕ ХЛЕБА

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.01

Аннотация

Молочнокислые бактерии получили широкое распространение благодаря активному применению в заквасках для производства хлеба. Представленные в обзоре данные подчеркивают тот факт, что хлебная закваска является важной составляющей, входящей в первичную микрофлору хлебобулочных продуктов. Выбор молочнокислых бактерий напрямую зависит не только от их эффективности в борьбе с возбудителем картофельной болезни хлеба, но и от других свойств. Такие параметры как органолептика, кислотонакопление и противогрибковая активность также являются основными критериями при выборе заквасочных микроорганизмов.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, закваска для хлеба, качество, безопасность.

Хлеб – один из наистарейших функциональных продуктов питания, воздействие которого на здоровье исследовано во многих научных работах [1].

На протяжении веков хлеб был основным продуктом питания населения мира. Это хлебобулочное изделие, приготовленное из теста, прошедшего процесс замеса, формования, брожения и выпечки. Качество хлеба, приготовленного из разных сортов муки, его безопасность с точки зрения микробиологии и пищевая ценность являются основными проблемами пищевой промышленности [2,3].

Заражение грибами при производстве хлеба является поводом для беспокойства, поскольку может сократить срок годности продукта, что приведет к экономическим потерям и недовольству потребителей. Споры грибов проникают в тесто преимущественно из сырья и воздуха предприятий. Основной альтернативой для борьбы с ними является использование консервантов; однако этот метод может потерять эффективность из-за устойчивости некоторых штаммов грибов к разрешенным консервантам. Напротив, использование коммерческих дезинфицирующих средств для снижения загрязнения окружающей среды, а в последнее время и биоконсервация, могут стать альтернативой контролю микробной нагрузки в хлебобулочных изделиях, замедляя порчу грибками и, следовательно, продлевая срок хранения хлеба [4].

Для решения всех вышеупомянутых проблем подбор и применение новых штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей с нужными биотехнологическими свойствами является перспективным направлением исследования, поскольку позволяет оптимизировать разводочный и производственный циклы приготовления закваски, а также обеспечить стабильное качество изделий и их устойчивость к микробной порче [5].

Качество некоторых дрожжевых хлебобулочных изделий на закваске не всегда стабильно, если для брожения теста не используется хорошо разведенная закваска. Среди различных типов используемых заквасочных культур интерес исследователей привлекла традиционная закваска, главным образом из-за ее большого микробного разнообразия, особенно в отношении молочнокислых бактерий [6]. Микробное разнообразие закваски в основном обусловлено следующими факторами:

1. закваска получается в результате самопроизвольной многоступенчатой ферментации;

2. закваска выращивается с использованием муки, содержание питательных веществ в которой может варьировать в зависимости от партии и культуры и которая естественным образом загрязнена микроорганизмами;

3. закваска соответствует специальным технологическим параметрам, которые варьируют в зависимости от исторических и культурных условий и вида выпечки.

В динамике популяций, ведущих от муки к зрелой закваске, молочнокислые бактерии (некоторые виды *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.* и *Weissella sp.*) и дрожжи (главным образом *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida sp.*) вытесняют другие микробные группы, загрязняющие муку, и взаимодействуют друг с другом на разных уровнях [7]. Параметры окружающей среды, которые качественно и количественно влияют на доминирующую микробиоту закваски, можно разделить на конкретные технологические параметры (например, процентное содержание закваски, используемой в качестве инокулята, время ферментации и температура) и параметры, которые не полностью контролируются (например, химический, ферментативный и микробиологический состав муки). Хотя имеются сообщения о том, что некоторые заквасочные культуры содержат стабильную доминирующую микробиоту, стабильность экосистемы закваски с течением времени остается спорной. Действительно, сохранению ассоциаций видов и штаммов, типичных для этой закваски, могут препятствовать несколько факторов: метаболическая адаптация к стрессовым условиям закваски, пищевые и антагонистические взаимодействия между микроорганизмами, внутренняя резистентность микроорганизмов и существование стабильной домашней микробиоты [8].

Молочнокислые бактерии (МКБ) играют важную роль в пищевой, сельскохозяйственной и клинической практике. По общему мнению, существует основная группа, состоящая из четырех родов: *лактобактерии*, *лейконосток*, *педиококк* и *стрептококк*. Недавние таксономические пересмотры предложили несколько новых родов, а оставшаяся группа теперь включает: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* и *Weissella*. Их важность связана главным образом с их безопасной метаболической активностью при выращивании в пищевых продуктах, использующих доступный сахар для производства органических кислот и других метаболитов. Их частое появление в пищевых продуктах наряду с их длительным использованием способствует их естественному признанию GRAS (общепризнанным безопасным) для потребления человеком [9].

Таблица 1 – Основные виды молочнокислых бактерий в производстве хлеба

№	Молочнокислые бактерии	Свойства	Ссылка
1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Повышение устойчивости к кислой среде	[10]
2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	Активный антагонист <i>Bacillus subtilis</i> – возбудителя картофельной болезни хлеба	[11]
3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Основная роль в процессе кислотонакопления при производстве пшеничных и ржаных заквасок	[12]
4	<i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> и <i>Levilactobacillus brevis</i>	Улучшение вкуса и аромата продукта, против плесневения, заболевания хлеба картофельной болезнью	[13]
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> и <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Увеличение срока хранения путем снижения pH, улучшает текстуру хлеба	[14]
6	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> и <i>Lentilactobacillus diolivorans</i>	Повышение противогрибковых свойств хлеба	[15]

МКБ имеют широкий спектр преимуществ, включая не только более безопасное, более ценное и устойчивое приготовление хлеба, но и решение проблем, связанных с повышением качества продукта. В таблице 1 приведены часто используемые в хлебопекарной промышленности виды и основные свойства молочнокислых бактерий.

Производство закваски – древний способ ферментации муки из злаков для изготовления хлебобулочных изделий. Процессы ферментации муки для производства закваски обычно осуществляются гетерогенными сообществами молочнокислых бактерий и дрожжей [16].

Изготовление хлеба на закваске считается типичным примером старого и традиционного процесса ферментации. Это первый способ производства хлеба с помощью естественной закваски, появившийся тысячи лет назад, в котором бессознательно использовались эндогенные молочнокислые бактерии (МКБ) и/или дрожжи, поскольку эти микроорганизмы присутствовали в сырье до тех пор, пока коммерческие дрожжи не появились в продаже. Сначала пивные дрожжи, начиная с средневековья, а затем пекарские дрожжи, начиная с 19 века использовались для закваски. Для производства закваски готовят смесь зерновой муки (фракций) и воды, которая либо сбраживается самопроизвольно и далее подвергается обратному процессу в случае традиционных заквасок, либо сбраживается в один этап в течение нескольких часов для несколько дней в случае промышленных заквасок. Полученные закваски используются в качестве функциональных ингредиентов хлебного теста для производства дрожжевого хлеба или для замены пекарских дрожжей при производстве традиционного хлеба на закваске. В настоящее время использование заквасок в качестве источника вкусовых, питательных и полезных для здоровья ингредиентов при выпечке хлеба становится все более популярным [17].

По результатам последних исследований, по улучшению качества хлеба и продлению срока хранения готового продукта, молочнокислые бактерии не только соответствуют данным требованиям, но также значительно улучшают вязкоупругость, характеристики текстуры, растяжимость и водоудерживающую способность закваски, обогащают аромат летучими соединениями, [18,19].

В целом, во многих работах, штаммы молочнокислых бактерий продемонстрировали антибактериальную активность против бактерий, вызывающих порчу хлеба, что делает их потенциальными агентами биоконтроля при производстве хлеба [20-22].

Целью многих работ является выявление наиболее эффективного способа борьбы с возбудителем картофельной болезни хлеба. По результатам исследований можно делать выводы, что внесение в рецептуру изделий смеси из органических кислот и МКБ способствовало улучшению физико-химических показателей изделий, при этом время развития картофельной болезни задерживалось до 120 часов [23].

Для повышения микробиологической устойчивости безглютеновых хлебобулочных изделий в Санкт-Петербургский Филиал Федерального Государственного Автономного Научного Учреждения «Научно-Исследовательский Институт Хлебопекарной Промышленности» изучена возможность использования при их производстве заквашенного полуфабриката, содержащего в своем составе чистые культуры молочнокислых бактерий. Выбор штаммов молочнокислых бактерий из коллекции основан на изучении их антагонистической активности в отношении возбудителей картофельной болезни хлеба [24].

Молочнокислые бактерии продуцируют антибактериальные вещества, к которым относятся бактериоцины, фунгицидные вещества, органические кислоты, пероксид водорода, пирролидон-5-карбоксильная кислота, диацетил и реутерин. Антагонистическая активность МКБ может быть обусловлена не только присутствием бактериоцинов, но и продукцией органических кислот (молочной, уксусной) и низким значением pH. Антагонистическая активность зависит от видовых и штаммовых особенностей штамма-продуцента и индикаторного штамма. Применение заквасок с направленным

культивированием МКБ, продуцирующих бактерицины и другие антимикробные вещества, может быть эффективным биологическим способом борьбы с микробной порчей хлеба и хорошей альтернативой химическим консервантам [25].

Боровска и др. исследовали использование гомоферментативных молочнокислых бактерий для производства цельнозернового хлеба с низким содержанием FODMAP (сбраживаемые олиго-ди-моносахариды и полиолы), которые рекомендуется людям с синдромом раздраженного кишечника. Три гомоферментативных штамма, *Lactiplantibacillus plantarum* FST1.7, *Lactiacaseibacillus paracasei* R3 и *Pediococcus pentosaceus* RYE106, были отобраны для ферментации закваски, в результате чего был получен хлеб с низким содержанием FODMAP [26].

Заключение

Как видно из представленного обзора, существует множество видов МКБ применяемых для получения хлебных заквасок. Помимо их применения в качестве чистых технологических штаммов в пищевой промышленности, учитывая антимикробные, противогрибковые и микробиом-модулирующие свойства этих микроорганизмов, они могут быть использованы в качестве важных составляющих в улучшении биологической ценности пищевых продуктов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Комитета Науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP19674612 Разработка отечественных смешанных заквасок для обеспечения качества и безопасности хлеба).

Литература:

- 1 Abebaw G., Duguma S. Review On: Progress In Wheat Bread Improvement: Emphasis on Ingredient Functionality. *Auctores Publishing LLC*. 2021, 4, 01–03. (<https://doi.org/10.31579/2637-8914/048>)
- 2 Randelović D., Bogdanović S., Zlatković I. Nutritional value and microbiological quality of various types of bread. *1st International Symposium On Biotechnology*, 2023, 381-386. (DOI: 10.46793/SBT28.381R)
- 3 Irene M. C. Pateras. Bread spoilage and staling. *Technology of Breadmaking*, 2002, 240-261. (https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2199-0_10)
- 4 Garcia M.V., Bernardi A.O., Copetti M.V. The fungal problem in bread production: insights of causes, consequences, and control methods. *The fungal problem in bread production: insights of causes, consequences, and control methods*. 2019, 29: 1-6. (<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.010>)
- 5 Локачук М.Н., Кузнецова Л.И., Савкина О.А., Павловская Е.Н., Парахина О.И., Барсукова Т.Т. Исследование влияния новых штаммов молочнокислых бактерий на качество густой ржаной закваски и хлеба. *Хлебопечение России*, 2019, 4: 32-35. (doi: 10.37443/2073-3569-2019-1-4-32-35)
- 6 Bender D., Fraberger V., Szepasvári P. Effects of selected lactobacilli on the functional properties and stability of gluten-free sourdough bread. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244: 1037–1046. (<https://doi.org/10.1007/s00217-017-3020-1>)
- 7 Novotni D., Ganzle M., Rocha J.M. Composition and activity of microbiota in sourdough and their effect on bread quality and safety. *Trends in Wheat and Bread Making*, 2020, 129-172. (DOI:10.1016/B978-0-12-821048-2.00005-2)
- 8 Calvert MD, Madden AA, Nichols LM, Haddad NM, Lahne J, Dunn RR, McKenney EA. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ Publishing*, 2021. (DOI: 10.7717/peerj.11389)
- 9 Calvert MD, Madden AA, Nichols LM, Haddad NM, Lahne J, Dunn RR, McKenney EA. A review of sourdough starters: ecology, practices, and sensory quality with applications for baking and recommendations for future research. *PeerJ Publishing*, 2021.
- 10 Bartkiene E., Vizbickiene D., Bartkevics V., Pugajeva I., Krungleviciute V., Zadeike D., Zavistanaviciute P., Juodeikiene G. Application of *Pediococcus acidilactici* LUHS29 immobilized in

apple pomace matrix for high value wheat-barley sourdough bread. *LWT-Food Sci. Технол.*, 2017,83: 157–164. (DOI:10.1016/j.lwt.2017.05.010)

11 Магажанов Ж.М., Чумакова А.В., Дудикова Г.Н., Супрун С.С. Штамм бактерий *Lactobacillus fermentum* 129 – активный антагонист *B.subtilis* – возбудителя картофельной болезни хлеба. *КазНИИППП*. Заявл. 13.10.2010. Оpubл. 15.12.2011. Бюл. № 12.

12 Лукин А.А., Меренкова С.П., Лигостаев Д.Г. Разработка технологии бездрожжевого хлеба. *Молодой ученый, Технические науки*, 2016, 11 (115): 411-414. (<https://moluch.ru/archive/115/30367/>)

13 Шабанова Э.М., Волкова О.В., Невская Е.В. Разработка и применение биозакваски с высокими антагонистическими свойствами для предупреждения картофельной болезни и плесневения хлеба. *Инновационные процессы в пищевых технологиях: наука и практика - 2019*. (<https://vniiz.org/science/publication/article-383/conf90-article-74>)

14 Микрофлора закваски. *Все о хлебе на закваске и здоровом питании*. (<http://sshleb.info/mikroflora-zakvaski/>)

15 Zhang C., Brandt M.J., Schwab C., Gänzle M.G. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiol.* 2010, 27(3):390-5. (doi: 10.1016/j.fm.2009.11.019)

16 Tolu V., Fraumene C., Carboni A., Loddo A., Sanna M., Fois S., Roggio T., Catzeddu P. Dynamics of Microbiota in Three Backslopped Liquid Sourdoughs That Were Triggered with the Same Starter Strains. *Fermentation.* 2022; 8(10):571. (<https://doi.org/10.3390/fermentation8100571>)

17 De Vuyst L., Comasio A., Kerrebroeck S.V. Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-flour ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023,63(15): 2447-2479. (doi: 10.1080/10408398.2021.1976100)

18 Sun L., Li X., Zhang Y., Yang W., Ma G., Ma N., Hu Q., Pei F. A novel lactic acid bacterium for improving the quality and shelf life of whole wheat bread. *Food Control*, 2020,109. (<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106914>)

19 SARAC E., ÇON A. Preventing of bread mould spoilage and reducing the use of calcium propionate in bread by using antifungal lactic acid bacteria. *European Food Science and Engineering.* 2022, 3:11-17. (<https://doi.org/10.55147/efse.1117033>)

20 Iosca G., Fugaban J.I., Özmerih S., Wätjen A.P., Kaas R.S., Hà Q., Shetty R., Pulvirenti A., De Vero L., Bang-Berthelsen C.H. Exploring the Inhibitory Activity of Selected Lactic Acid Bacteria against Bread Spoilage Agents. *Fermentation.* 2023, 9(3):290. (<https://doi.org/10.3390/fermentation9030290>)

21 Bungenstock L., Abdulmawjood A., Reich F. Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS One.* 2020, 15(3):e0230345. (doi: 10.1371/journal.pone.0230345)

22 Gregirchak N., Stabnikova O., Stabnikov V. Application of Lactic Acid Bacteria for Coating of Wheat Bread to Protect it from Microbial Spoilage. *Plant Foods Hum Nutr.* 2020,75(2):223-229. (doi: 10.1007/s11130-020-00803-5)

23 Невская Е.В., Козионов А.В., Носова М.В. Исследование влияния некоторых консервантов и молочнокислых бактерий на возбудителей картофельной болезни хлеба. *Велес.* 2016, 7-1: 50-53. (<https://www.elibrary.ru/wmlytl>)

24 Дубровская Н.О., Кузнецова Л.И., Парахина О.И. Способ повышения микробиологической устойчивости безглютенового хлеба. *Хлебопечение России.* 2017, 4: 22-24. (<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=30318658>)

25 Локачук М.Н., Павловская Е.Н., Савкина О.А. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий как способ подавления микробной порчи хлеба. *Хлебопродукты.* 2020, 6:45-48. (<https://elibrary.ru/item.asp?id=43777576>)

26 Borowska M., Ispiryan L., Neylon E., Sahin A.W., Murphy C.P., Zannini E., Arendt E.K., Coffey A. Screening and Application of Novel Homofermentative Lactic Acid Bacteria Results in Low-FODMAP Whole-Wheat Bread. *Fermentation.* 2023; 9(4):336. (<https://doi.org/10.3390/fermentation9040336>)

IRSTI: 68.37.13

N.A. MEIRBEKOV¹, A.B. IBRAIMOV^{1,2*}, Y.A. SYRGABEK¹, S.S. YEGEMOVA¹,
S.E. BATYRBEKOVA¹, S. Zh. KAZYBAYEVA³

¹Al-Farabi Kazakh National University, Scientific Research Institute of New Chemical
Technologies and Materials, Almaty, Kazakhstan

²Scientific Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

³Kazakh Research Institute of Fruit and Vegetable Growing, Almaty, Kazakhstan

*e-mail.: a_bolatbekovich11@mail.ru

PATHOGENIC MICROORGANISMS OF GRAPES: MECHANISM OF INFECTION AND METHODS OF PROTECTION

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.02

Abstract

The grape (*Vitis vinifera*) is one of the most important fruit plant species with a wide distribution throughout the world. Commercial grape varieties are susceptible to significant exposure to a variety of pathogenic microorganisms that can cause disease in plants both pre-harvest and post-harvest. These diseases significantly affect the production, processing and export of grapes, as well as their quality. Potential threats include bacteria, fungi, oomycetes and viruses, which have different life cycles, infection mechanisms and survival strategies. The interaction between grapes and pathogens involves cycles of resistance and susceptibility, the study of which allows us to identify resistance traits inherent in natural resources and use them in the breeding process to ensure sustainable agriculture. This review summarizes the main diseases affecting *Vitis vinifera*, including their causative agents. A comprehensive analysis of the infection strategies employed by different types of pathogens is also carried out, considering the plant response to infection in both resistant and susceptible scenarios. In addition, new methods used to assess the condition of grapes under conditions of biotic stress are discussed, as well as scientifically based procedures that are necessary to combat plant diseases and protect the crop from them.

Keywords: grape, pathogenic microorganisms, infection mechanism, resistance, plant protection.

Grapes are one of the most valuable fruit crops in the world [1]. These varieties are extensively cultivated for both fresh consumption and processing purposes. The majority of grapes produced worldwide are used to make wine, as well as other processed products such as jams, jellies and juices [2]. Grapes belong to the *Vitaceae* family, which includes more than 17 genera and more than 1000 species native to North America, Asia and Europe [3-5].

In the field of viticulture, the choice of grape variety not only influences the quality and quantity of the harvest but also plays a crucial role in determining the feasibility and economic viability of cultivating crops in specific regions. Issues of scientific organization of the raw material base of viticulture and winemaking in Kazakhstan occupy a leading place in solving the problems of further development of viticulture. The development of industrial viticulture in Kazakhstan began in the late 50s of the last century, and by the mid-80s the area of vineyards was 26,000 hectares, and the total grape harvest reached about 200,000 tons per year [6]. As outlined in the "Program for the Restoration and Development of Viticulture in Kazakhstan" for the period 2001-2020, the total grape cultivation area was below 9.5 thousand hectares. According to official information from the Almaty region statistics department, there are currently vineyard fields in various cities of the region, including Aksu, Balkhash, Taraz, Zharkent, Kapchagay, Sarkand, Talgar, Taldykorgan, and Tekeli [6].

Economically valuable varieties for cultivation in Kazakhstan are: Taifi; Terbash; Bayan Shirey; Huseyn Ak; Ashgabat intermediate black grapes; Gulja; Hungarian Muscat; black raisins; Nimrang [6]. According to the National Bureau of Statistics, there was a high intensity of grape production between 2012 and 2022 (Figure 1).

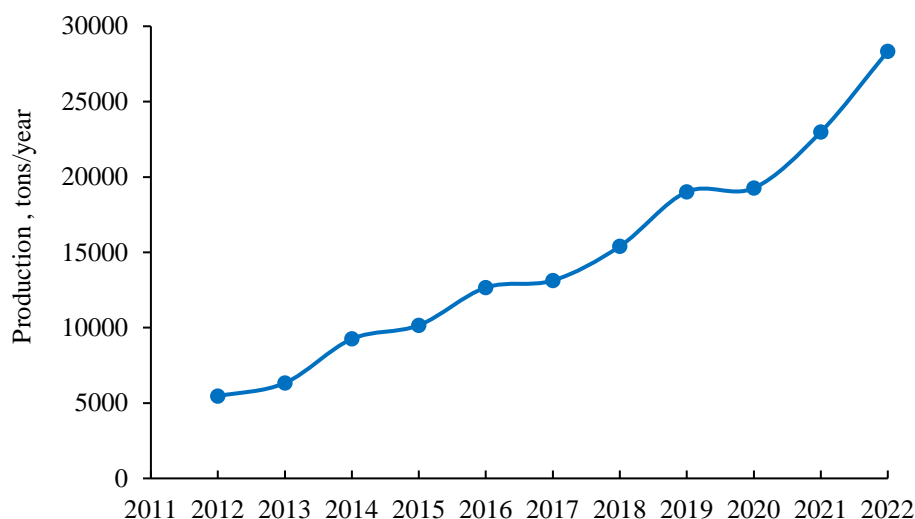


Figure 1 – Grape production in the Republic of Kazakhstan 2012-2022 year

During their life cycle, plants are exposed to a variety of pathogens, including bacteria, viruses, fungi and nematodes. Depending on the characteristics of their life cycle and the strategy of influencing the plant, pathogenic microorganisms can be classified as necrotrophs, biotrophs and hemibiotrophs [7]. Necrotrophic pathogens extract nutrients from dead tissue, in the process releasing lytic enzymes and phytotoxins that promote the destruction of host plant cells. Biotrophic pathogens, on the contrary, feed on living tissues, developing structures to penetrate the cell and obtain the products of its metabolism [8-10]. Hemibiotrophic pathogens exhibit both biotrophic and necrotrophic pathogen traits, starting with the biotrophic infection phase and then moving to the necrotrophic infection phase, leading to the death of grapes [11].

Diseases: mechanism and symptoms of infection

Infectious diseases are caused by specific fungi, viruses and bacteria. As a rule, they settle on living tissues and, accumulating in the plant, lead to its death. Pathogens are transferred from the affected plant to healthy bushes by wind, rain, or untreated tools. Gradually, the infection accumulates in the soil and fallen leaves and if protective measures are not taken, can destroy the entire crop. Some of the most important diseases of *Vitis vinifera* are gray mold, powdery mildew and downy mildew caused by *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*, respectively.

Plant defense mechanisms are strictly regulated by signaling using hormones, predominantly jasmonic acid and salicylic acid. It is generally accepted that jasmonic acid and ethylene play a key role in activating defense mechanisms against necrotrophic pathogens, while salicylic acid is involved in providing protection against biotrophic and hemibiotrophic pathogens. [12]. In addition, some phospholipids released during plasma membrane degradation can directly stimulate jasmonic acid biosynthesis [13]. An increase in the concentration of jasmonic acid leads to activation of the expression of genes responsible for the synthesis of protective enzymes and molecules. These genes include glucanases, chitinases, protease inhibitors, and enzymes involved in the biosynthesis of secondary metabolites such as phytoalexins. These components play an important role in protecting plants from necrotrophic pathogens and helping to maintain their viability. Salicylic acid, on the other hand, plays an important role in mediating plant defense responses to biotrophic and hemibiotrophic pathogens. This response involves an increase in reactive oxygen species and the resulting localized programmed cell death in infected tissues. This defense mechanism is known as the hypersensitive response and serves to limit the growth of pathogens by limiting their access to nutrients and water. On the other hand, salicylic acid mediates the response to biotrophic and hemibiotrophic pathogens by causing an increase in reactive oxygen

species and consequently localized programmed cell death in the infected tissue [14]. Table 1 provides data on the mechanism and symptoms of infection with the most common grape diseases.

Table 1 – Diseases, mechanism, and symptoms of grape infection with diseases [15]






Grape disease 1	Mechanism of infection 2	Symptoms 3
 <p>Gray rot caused by a fungus <i>Botrytis cinerea</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - the first mechanism involves direct penetration of the mycelium through pores or lesions on the surface of the skin of grape berries; - the second mechanism, called early invasion, involves infection of the berries before their stigmas and stems ripen. 	<ul style="list-style-type: none"> - a plaque in the form of mouse-shaped mold covers the ripening berries, without affecting the green ones, which contain many acids; - the berries become lethargic, then turn slightly brown and fall off.
 <p>Oidium (powdery mildew) caused by the biotrophic fungus <i>Erysiphe necator</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - attaches to grape tissue cells, forming the primary germ tube (haustorium). - with the help of haustoria, the fungus extracts the nutrients necessary for its life cycle from the cells of the grape. 	<ul style="list-style-type: none"> - first in the form of a dirty-gray coating of varying consistency on the upper side of the leaves, necrosis of the leaf veins, later oily to the touch spots appear with a pronounced smell of rotten herring; - the plant gradually becomes covered with a soft coating of a characteristic gray-ash color.
 <p>Mildew (downy mildew) caused by the biotrophic oomycete <i>Plasmopara viticola</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - in the presence of water, mature sporangia release zoospores that infect plant tissues; - zoospores grows through the intercellular spaces, is surrounded by leaf veins and penetrates the grapes. 	<ul style="list-style-type: none"> - yellow, oily, round spots form on the leaves on the upper side; - in humid weather, a white powdery coating forms on the underside of the leaf; - Over time, the leaves become reddish-brown.
 <p>Bacterial cancer caused by the biotrophic fungus <i>Agrobacterium vitis</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - penetrates the DNA of cells and provokes the production of huge amounts of auxins and cytokinin's, which leads to rapid growth of the tumor; - over time, the part of the bush located above the tumor dies because of tissue conduction disturbances. 	<ul style="list-style-type: none"> - a growth in the form of a swelling on perennial wood, annual vines or roots.

Table 1 continued

1	2	3
 <p data-bbox="295 510 595 604">Pierce's disease gram-negative bacterium <i>Xylella fastidiosa</i></p>	<p data-bbox="675 230 1088 526">- vector plants such as <i>Homalodisca coagulata</i>, <i>Cicadellidae</i> and <i>Cercopoidea</i> infect grapes, creating a biofilm while feeding on xylem sap, mainly water-conducting tissue. - biofilm in xylem vessels disrupts the flow of water and nutrients through it.</p>	<p data-bbox="1110 230 1468 526">- sudden drying out of a large part of the leaf blade; - more severe yellowing, drying, and falling of leaves are observed; - dwarfism of shoots and stunted growth of stems, as well as dehydration of grape bunches are observed.</p>

The fungus *Botrytis cinerea* has the ability to exist as a parasite in living green plant tissues, and as a saprophyte in dead or decaying tissues. This dual ability allows it to be widely distributed in nature and determines its indiscriminate nature towards various plant species, including grapes [14]. The problem requires careful monitoring and measures to protect grape crops from this fungus in order to ensure the quality and safety of the harvest and wine industry products [15, 16]. Powdery mildew of grapes leads to significant losses in production, as it reduces both the yield and the quality of the fruit. The main negative effect is manifested in a decrease in the sugar content and acidity in grapes, which affects its characteristics and taste [17].

The *Erysiphe necator* fungus extracts hexoses, amino acids, vitamins and other nutrients from grapes while secreting proteins that suppress the plant's defense mechanisms. This interaction allows the fungus to successfully provide itself with nutrients and complete its life cycle [18, 19]. Resveratrol and its derivatives, such as viniferines, are bioactive compounds that may be involved in plant defense responses to pathogens. They may have antioxidant and antifungal properties, making them important components in grape defense mechanisms against powdery mildew. Increasing the level of resveratrol and viniferins can help increase the resistance of grapevine varieties to this disease and reduce its negative impact on yield and fruit quality [20].

Infection of grapes with the specific pathogen *Agrobacterium vitis* usually begins through plant damage, especially as a result of freezing and/or mechanical wounds, which promotes the release of phenolic compounds that act as chemoattractants on attached bacteria [21]. These compounds activate the transcription of genes, the products of which induce the transfer of fungal DNA into the grape genome [22].

Pierce's disease, caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*, is an economically significant disease affecting the production of wine, table grapes and raisins [23-25]. Grapes infected with the bacterium *Xylella fastidiosa* use physical or chemical barriers after infection, such as tylose. Tylosis is the proliferation of parenchyma cells through pairs of vascular pits into the lumen of the tracheal elements. The initiation of tylose formation happens at a pace that is insufficient to control the proliferation of mobile pathogens like *Xylella fastidiosa*.

Plant protection from diseases

Detecting grape diseases poses a challenging and resource-demanding endeavor, particularly when it comes to the third aspect of pinpointing the pathogen and devising dependable strategies to mitigate or minimize economic losses. However, when it comes to treating grape diseases, some available approaches are too expensive and/or unsuitable [26]. Since most varieties of *Vitis vinifera* are affected by these pathogens, wine and fresh grape production are dependent to varying degrees on the application of control methods [27]. Various methods are used to protect grapes from pathogens, including cultural controls such as thinning and culling, cold treatment (holding plants at low temperatures to prevent or eradicate pathogens), chemical control using contact and systemic agents, and biological control. using biopesticides to reduce the use of chemical pesticides [28].

Currently, integrated disease management, which includes combined methods to mitigate the threat from these pathogens and minimize negative environmental and health impacts, represents a partially effective, cost-effective and sustainable way to address the problems [29]. One of the most commonly used approaches is chemical control, which includes various classes of chemicals such as copper compounds, sulfur compounds, dithiocarbamates, benzimidazoles, antibiotics and others [30-32]. Although these chemicals are effective against fungal and bacterial pathogens, they have little effect on viral diseases. In addition, some of them can be dangerous to organisms, including viruses that transmit viral diseases. However, this method is not always effective and may not prevent future infections [33].

Modern methods of controlling grape diseases typically combine various approaches, including genetic resistance, the use of biological controls and modern monitoring technologies, to provide optimal protection to the grapevines and reduce the use of chemical fungicides. Nanomaterials and nanoparticles can be used to develop new formulations of fungicides, which increases effectiveness and reduces the need for their use [34-36]. Developing grape varieties that have built-in resistance to certain diseases is one effective method. This reduces the need for chemical treatment. Scientific research in the field of genetic engineering may lead to the creation of grape varieties with improved disease resistance [37-39]. Grape growers are increasingly adopting sustainable cultivation practices that help reduce the risk of disease, such as managing weeds, attracting beneficial insects, and improving soil structure [40, 41]. Another promising approach is to use biotechnology, such as creating biologics from plant extracts that contain pathogen resistance elements. This method could be an effective strategy applicable to agriculture in the future. Application of biologicals and microorganisms such as microbes, bacteria and fungi that compete with disease pathogens in soil or plants helps reduce the spread of diseases [42-44].

Conclusion

Modern methods of protecting grapes from diseases integrate various approaches such as genetic resistance, biological controls and modern technologies to provide optimal protection and reduce dependence on traditional fungicides. This includes developing genetically resistant grape varieties that reduce the need for chemical treatments. Biologicals and microorganisms that compete with soil and plant pathogens reduce the spread of disease. Application of nanotechnology to create more effective fungicides. Using modern monitoring technologies with sensors and the Internet of Things network for real-time monitoring of the condition of the vines and the environment. Environmentally sustainable cropping practices, such as weed control and the attraction of beneficial organisms, help reduce the risk of disease. Thus, modern methods of combating grape diseases include advanced technologies and scientific developments.

Funding

The work was carried out within the framework of the grant funding project of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan AP19680563 «Development of a biological product to increase the yield of grapes».

References:

- 1 Azevedo-Nogueira F., Rego C., Gonçalves H.M.R., Fortes A.M., Gramaje D., Martins-Lopes P. The road to molecular identification and detection of fungal grapevine trunk diseases. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 960289. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.960289>)
- 2 Gramaje D., Úrbez-Torres J.R., Sosnowski M.R. Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant disease*, 2018, 102(1): 12–39. (<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>)
- 3 Muntean M.D., Drăgulescu A.M., Tomoiagă L.L., Comşa M., Răcoare H.S., Sîrbu A.D., Chedea V. S. Fungal Grapevine Trunk Diseases in Romanian Vineyards in the Context of the International Situation. *Pathogens*, 2022, 11(9): 1006. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11091006>)

- 4 Songy A., Fernandez O., Clément C., Larignon P., Fontaine F. Grapevine trunk diseases under thermal and water stresses. *Planta*, 2019, 249(6): 1655–1679. (<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03111-8>)
- 5 Díaz G.A., Reveglia P., Tomoiagă L.L., Chedea V.S. Editorial: Fungal pathogens causing the grapevine trunk diseases- biology and identification. *Frontiers in fungal biology*, 2023, 4: 1186166. (<https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1186166>)
- 6 Kulzhanov S.N., Kazybayeva S.Z., Tazhibayev T.S., Azhitaeva L.A. Yessenaliyeva M. Effect of climatic conditions on the productive and biochemical characteristics of grape varieties grown on sierozem soil. *Eurasian Journal of Soil Science*, 2022, 11 (2): 174-183 (<https://doi.org/10.18393/ejss.1057156>)
- 7 Hernandez M.N., Kc A.N.A Systematic Survey on Prevalence of Grapevine Trunk Disease Pathogens in Oregon Vineyards. *Plant disease*, 2023, 107(5): 1355–1364. (<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1220-RE>)
- 8 Niem J.M., Billones-Baaijens R., Stodart B., Savocchia S. Diversity Profiling of Grapevine Microbial Endosphere and Antagonistic Potential of Endophytic *Pseudomonas* Against Grapevine Trunk Diseases. *Frontiers in microbiology*, 2022, 11: 477. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00477>)
- 9 Bustamante M.I., Elfar K., Eskalen A. Evaluation of the Antifungal Activity of Endophytic and Rhizospheric Bacteria against Grapevine Trunk Pathogens. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2035. (<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102035>)
- 10 Mannerucci F., D'Ambrosio G., Regina N., Schiavone D., Bruno G.L. New Potential Biological Limiters of the Main Esca-Associated Fungi in Grapevine. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2099. (<https://doi.org/10.3390/microorganisms11082099>)
- 11 Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P. Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 382. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>)
- 12 Pieterse C. M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 2009, 5(5): 308–316. (<https://doi.org/10.1038/nchembio.164>)
- 13 Robert-Seilaniantz A., Grant M., Jones, J.D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, 2011, 49, 317–343. (<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>)
- 14 Viret O., Keller M., Jaudzems, V.G., Cole, F.M. Botrytis cinerea Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites. *Phytopathology*, 2004, 94(8): 850–857. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.8.850>)
- 15 Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 2012, 13(4): 414–430. (<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>)
- 16 Rolke Y., Liu S., Quidde T., Williamson B., Schouten A., Weltring K.M., Siewers V., Tenberge K. B., Tudzynski B., Tudzynski P. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in Botrytis cinerea: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular plant pathology*, 2004, 5(1): 17–27. (<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00201.x>)
- 17 Calonnec A., Cartolaro P., Poupot C., Dubourdiou D., Darriet P. (2004). Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathol.* 2004, 53: 434–445. (<https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01016.x>)
- 18 Qiu W., Feechan A., Dry I. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture research*, 2015, 2: 15020. (<https://doi.org/10.1038/hortres.2015.20>)
- 19 Gadoury D.M., Cadle-Davidson L., Wilcox W.F., Dry I.B., Seem R.C., Milgroom M.G. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology, and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*, 2012, 13(1): 1–16. (<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x>)
- 20 Dai R., Ge H., Howard S., Qiu W. Transcriptional expression of Stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet Sauvignon grapevine. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 2012, 197: 70–76. (<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.004>)

- 21 Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: Biology and Disease Management. *Annual review of phytopathology*, 1999, 37: 53–80. (<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.53>)
- 22 Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Crown Gall of Grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the Development of Disease Control Strategies. *Plant Disease*, 1998, 82(12): 1288–1297. (<https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.12.1288>)
- 23 Newman K.L., Almeida R.P., Purcell A.H., Lindow S.E. Use of a green, fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and environmental microbiology*, 2003, 69(12): 7319–7327. (<https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7319-7327.2003>)
- 24 Roper M.C., Greve L.C., Warren J.G., Labavitch J.M., Kirkpatrick B.C. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular plant-microbe interactions*, 2007, 20(4): 411–419. (<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0411>)
- 25 Sun Q., Rost T.L., Matthews M.A. Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American journal of botany*, 2006, 93(11): 1567–1576. (<https://doi.org/10.3732/ajb.93.11.1567>)
- 26 Kamoun S., Furzer O., Jones J. D., Judelson H.S., Ali G.S. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 2015, 16(4): 413–434. (<https://doi.org/10.1111/mpp.12190>)
- 27 Lieth J.H., Meyer M.M., Yeo K.H., Kirkpatrick B. C. Modeling cold curing of Pierce's disease in *Vitis vinifera* 'Pinot Noir' and 'Cabernet Sauvignon' grapevines in California. *Phytopathology*, 2011, 101(12): 1492–1500. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-10-0207>)
- 28 Pedro H., Maheswari U., Urban M., Irvine A. G., Cuzick A., McDowall M. D., Staines D. M., Kulesha E., Hammond-Kosack K. E., Kersey P. J. PhytoPath: an integrative resource for plant pathogen genomics. *Nucleic acids research*, 2016, 44: 688–693. (<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1052>)
- 29 Swinnen G., Goossens A., Pauwels L. Lessons from Domestication: Targeting Cis-Regulatory Elements for Crop Improvement. *Trends in plant science*, 2016, 21(6): 506–515. (<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.014>)
- 30 Calvo-Garrido C., Viñas I., Elmer P.A., Usall J., Teixidó N. Suppression of *Botrytis cinerea* on necrotic grapevine tissues by early-season applications of natural products and biological control agents. *Pest management science*, 2014, 70(4): 595–602. (<https://doi.org/10.1002/ps.3587>)
- 31 Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 2015, 47, 85–92. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>)
- 32 Almeida R.P., Daane K.M., Bell V. A., Blaisdell G.K., Cooper M.L., Herrbach E., Pietersen G. Ecology, and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 94. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094>)
- 33 Jelly N.S., Schellenbaum P., Walter B., Maillot P. Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic research*, 2012, 21(6): 1319–1327. (<https://doi.org/10.1007/s11248-012-9611-5>)
- 34 Vizitiu D.E., Sardaescu D.I., Fierascu I., Fierascu R.C., Soare L.C., Ungureanu C., Buciumeanu E.C., Guta I.C., Pandelea L.M. Grapevine Plants Management Using Natural Extracts and Phytosynthesized Silver Nanoparticles. *Materials*, 2022, 15(22): 8188. (<https://doi.org/10.3390/ma15228188>)
- 35 Michailidu J., Mařátková O., Kolouchová I., Masák J., Čejková A. Silver Nanoparticle Production Mediated by *Vitis vinifera* Cane Extract: Characterization and Antibacterial Activity Evaluation. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(3): 443. (<https://doi.org/10.3390/plants11030443>)
- 36 Miřkovská A., Rabochová M., Michailidu J., Masák J., Čejková A., Lorinčík J., Mařátková O. Antibiofilm activity of silver nanoparticles biosynthesized using viticultural waste. *PloS one*, 2022, 17(8): e0272844. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272844>)
- 37 Foria S., Monte C., Testolin R., Di Gaspero G., Cipriani G. Pyramidizing resistance genes in grape: a breeding program for the selection of elite cultivars. *Acta Horti*, 2019, 1248: 549–554, (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1248.73>)
- 38 Salotti I., Bove F., Ji T., Rossi V. Information on disease resistance patterns of grape varieties may improve disease management. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 1017658. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1017658>)
- 39 Di Gaspero G., Cattonaro F. Application of genomics to grapevine improvement. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2010, 16: 122–130. (<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00072.x>)

40 Giffard B., Winter S., Guidoni S., et al. Vineyard Management and Its Impacts on Soil Biodiversity, Functions, and Ecosystem Services. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2022, 10: 850272. (<https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850272>)

41 Jonas J.L., Wilson G. W.T., White P.M., Joern A. Consumption of mycorrhizal and saprophytic fungi by Collembola in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(10): 2594–2602. (<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.004>)

42 Zhang H., Godana E. A., Sui Y., Yang Q., Zhang X., Zhao L. Biological control as an alternative to synthetic fungicides for the management of grey and blue mould diseases of table grapes: a review. *Critical reviews in microbiology*, 2020, 46(4): 450–462. (<https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1794793>)

43 Rotolo C., De Miccolis Angelini R.M., Dongiovanni C., Pollastro S., Fumarola G., Di Carolo M., Perrelli D., Natale P., Faretra F. Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of Botrytis cinerea in table grape vineyards. *Pest management science*, 2018, 74(3): 715–725. (<https://doi.org/10.1002/ps.4767>)

44 Esteves M., Lage P., Sousa J., Centeno F., de Fátima Teixeira M., Tenreiro R., Mendes-Ferreira A. Biocontrol potential of wine yeasts against four grape phytopathogenic fungi disclosed by time-course monitoring of inhibitory activities. *Frontiers in microbiology*, 2023, 14, 1146065. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146065>)

Н.А. МЕЙРБЕКОВ¹, А.Б. ИБРАИМОВ^{1,2*}, Е.А. СЫРФАБЕК¹, С.С. ЕГЕМОВА¹,
С.Е. БАТЫРБЕКОВА¹, С.Ж. КАЗЫБАЕВА³

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Жаңа химиялық технологиялар мен материалдар ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

²Микробиология және вирусология ғылыми -өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

³Қазақ бау-бақша шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail.: a_bolatbekovich11@mail.ru

ЖҮЗІМНІҢ ПАТОГЕНДІ МИКРООРГАНИЗДЕРІ: ИНФЕКЦИЯ МЕХАНИЗМІ ЖӘНЕ ҚОРҒАУ ӘДІСТЕРІ

Түйін

Жүзім (*Vitis vinifera*) бүкіл әлемде кеңінен таралған ең маңызды жеміс өсімдіктерінің бірі болып табылады. Жүзімнің коммерциялық сорттары егін жинауға және жинаудан кейін де ауру тудыруы мүмкін әртүрлі патогендік микроорганизмдерге айтарлықтай әсер етеді. Бұл аурулар жүзімді өндіруге, өңдеуге және экспорттауға, сондай-ақ олардың сапасына айтарлықтай әсер етеді. Ықтималды микроорганизмдерге бактериялар, саңырауқұлақтар, омицеттер және вирустар жатады, олардың өмірлік циклдері, инфекция механизмдері және өмір сүру стратегиялары әртүрлі. Жүзімнің патогенді микроорганиздері өзара әрекеттесуі төзімділік пен сезімталдық циклдарын қамтиды, оларды зерттеу табиғи ресурстарға тән қарсылық белгілерін анықтауға және оларды тұрақты ауыл шаруашылығын қамтамасыз ету үшін өсіру процесінде пайдалануға мүмкіндік береді. Бұл шолуда жүзімге әсер ететін негізгі аурулар, соның ішінде олармен күресу жолдары келтірілген. Сонымен қатар, биотикалық стресс кезінде жүзімнің жағдайын бағалау үшін қолданылатын жаңа әдістер, сондай-ақ өсімдік ауруларымен күресу және қорғау үшін қажетті ғылыммен негізделген сұрақтар талқыланады.

Кілтті сөздер: жүзім, патогенді микроорганизмдер, инфекция механизмі, төзімділік, өсімдіктерді қорғау.

MPНТИ: 68.37.13

Н.А. МЕЙРБЕКОВ¹, А.Б. ИБРАИМОВ^{1,2*}, Е.А. СЫРГАБЕК¹, С.С. ЕГЕМОВА¹,
С.Е. БАТЫРБЕКОВА¹, С.Ж. КАЗЫБАЕВА³

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Научно-исследовательский институт Новых химических технологий и материалов, Алматы, Казахстан

²Научно- производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

³Казахский научно-исследовательский институт плодоовощеводства, Алматы, Казахстан

*e-mail.: a_bolatbekovich11@mail.ru

ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ВИНОГРАДА: МЕХАНИЗМ ЗАРАЖЕНИЯ И МЕТОДЫ ЗАЩИТЫ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.02

Аннотация

Виноград (*Vitis vinifera*) является одним из наиболее важных видов фруктовых растений, имеющих широкое распространение по всему миру. Коммерческие сорта винограда подвержены серьезному воздействию разнообразных патогенных микроорганизмов, которые способны вызывать заболевания в растениях как в период до сбора урожая, так и после него. Эти заболевания существенно влияют на производство, обработку и экспорт винограда, а также на его качество. Среди потенциальных угроз можно выделить бактерии, грибы, оомицеты и вирусы, которые характеризуются различными жизненными циклами, механизмами заражения и стратегиями выживания. Взаимодействие между виноградом и патогенами подразумевает наличие циклов устойчивости и восприимчивости, исследование которых позволяет выявить признаки устойчивости, присущие природным ресурсам, и использовать их в процессе селекции с целью обеспечения устойчивого сельского хозяйства. В данном обзоре обобщаются основные заболевания, воздействующие на *Vitis vinifera*, включая их возбудителей. Также проведен всесторонний анализ стратегий инфекции, применяемых различными типами патогенов, с учетом реакции растения на инфекцию в сценариях как устойчивости, так и восприимчивости. Кроме того, рассматриваются новые методы, применяемые для оценки состояния винограда в условиях биотических стрессов, а также научно обоснованные процедуры, которые необходимы для борьбы с болезнями растений и защиты урожая от них.

Ключевые слова: виноград, патогенные микроорганизмы, механизм заражения, устойчивость, защита растений.

Виноград – одна из самых ценных плодовых культур в мире [1]. Его широко выращивают для потребления в свежем и переработанном виде. Большая часть винограда, производимого во всем мире, используется для изготовления вина, а также - в составе других перерабатываемых продуктов, таких как джемы, желе и соки [2]. Виноград принадлежит к семейству *Vitaceae*, которое включает более 17 родов и более 1000 видов произрастающих в Северной Америке, Азии и Европе [3-5].

Сорт в виноградарстве определяет не только качество и количество урожая, но также возможность и экономическую эффективность выращивания сельскохозяйственных культур в определенных регионах. Вопросы научной организации сырьевой базы виноградарства и виноделия Казахстана занимают ведущее место в решении задач дальнейшего развития виноградарства. Развитие промышленного виноградарства в Казахстане началось в конце 50-х годов прошлого века, и к середине 80-х годов площадь виноградников составляла 26 000 га, а общий урожай винограда достигал около 200 000 тонн в год [6]. По данным «Программы восстановления и развития виноградарства в Казахстане» на 2001-2020 годы площадь виноградных насаждений составляла менее 9,5 тыс. га. По официальным данным управления статистики Алматинской области, в

настоящее время в городах регионе имеется поля виноградников в городах Аксу, Балхаш, Тараз, Жаркент, Капчагай, Сарканд, Талгар, Талдыкорган, Текели [6].

Хозяйственно ценными сортами для выращивания в Казахстана являются: Тайфи розовый, Тербаш, Баян Ширей, Гусейн Ак, виноград черный Ашхабадский промежуточный, Кульджа, Мускат венгерский, изюм черный, Нимранг [6]. Согласно данным Национального бюро статистики, в 2012–2022 годах наблюдалась высокая интенсивность производства винограда (рисунок 1).

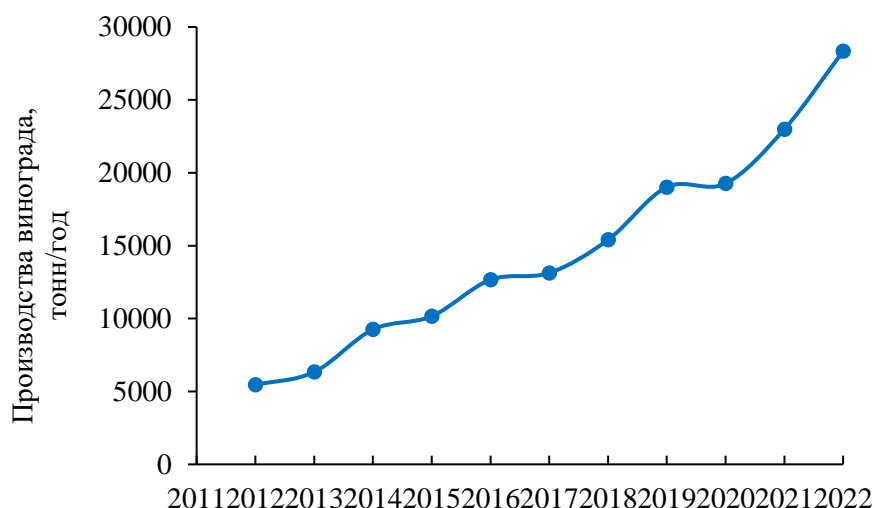


Рисунок 1 – Производство винограда в Республики Казахстан в 2012-2022 годы

В течение своего жизненного цикла растения подвергаются воздействию разнообразных патогенов, включая бактерии, вирусы, грибы и нематоды. В зависимости от особенностей их жизненного цикла и стратегии воздействия на растение, патогенные микроорганизмы могут быть классифицированы как некротрофы, биотрофы и гембиотрофы [7]. Некротрофные патогены извлекают питательные вещества из мертвых тканей, выделяя в процессе литические ферменты и фитотоксины, которые способствуют разрушению клеток растения-хозяина. Биотрофные патогены, напротив, питаются за счет живых тканей, развивая структуры для проникновения в клетку и получения продуктов ее метаболизма [8-10]. Гембиотрофные патогены проявляют как черты биотрофных, так и некротрофных патогенов, начиная с фазы биотрофной инфекции и затем переходят к фазе некротрофной инфекции, приводящей к гибели винограда [11].




Болезни, механизм и симптомы заражения

Инфекционные болезни вызываются специфическими грибами, вирусами и бактериями. Как правило, они поселяются на живых тканях и, накапливаясь в растении, приводят к его гибели. С пораженного растения ветром, дождем, необработанными инструментами патогены переносятся на здоровые кусты. Постепенно инфекция накапливается в почве и опавшей листве и, если не проводить защитные меры, может уничтожить весь урожай. Некоторые из наиболее важных заболеваний *Vitis vinifera* - это серая гниль, мучнистая роса и ложная мучнистая роса, вызываемые, *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator* и *Plasmopara viticola*, соответственно.

Защитные механизмы растений строго регулируются путем передачи сигналов с использованием гормонов, преимущественно жасмоновой кислоты и салициловой кислоты. Общеизвестно, что жасмоновая кислота и этилен играют ключевую роль в активации защитных механизмов против некротрофных патогенов, в то время как салициловая кислота участвует в обеспечении защиты от биотрофных и гембиотрофных патогенов. [12]. Кроме того, некоторые фосфолипиды, высвобождаемые при деградации

плазматической мембраны, могут напрямую стимулировать биосинтез жасмоновой кислоты [13]. Увеличение концентрации жасмоновой кислоты приводит к активации экспрессии генов, ответственных за синтез защитных ферментов и молекул. К таким генам относятся глюканазы, хитиназы, ингибиторы протеаз и ферменты, участвующие в биосинтезе вторичных метаболитов, таких как фитоалексины. Эти компоненты играют важную роль в защите растений от некротрофных патогенов и способствуют сохранению их жизнеспособности. Салициловая кислота, с другой стороны, играет важную роль в медиации защитного ответа растений на биотрофные и гемибитрофные патогены. Этот ответ включает увеличение активных форм кислорода и, в результате локализованную запрограммированную гибель клеток в инфицированных тканях. Этот механизм защиты известен как гиперчувствительная реакция и служит для ограничения роста патогенов путем ограничения их доступа к питательным веществам и воде. С другой стороны, салициловая кислота опосредует ответ на биотрофные и гемибитрофные патогены, вызывая увеличение количества активных форм кислорода и, следовательно, локализованную запрограммированную гибель клеток в инфицированной ткани [14]. В таблице 1 предоставлены данные о механизме и симптомах заражения наиболее распространёнными заболеваниями винограда.

Таблица 1 – Болезни, механизм и симптомы заражения винограда заболеваниями [15]

Болезнь винограда	Механизм заражения	Симптомы
1	2	3
 <p>Серая гниль вызывается грибом <i>Botrytis cinerea</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - первый механизм включает в себя прямое проникновение мицелия через поры или повреждения на поверхности кожи виноградных ягод; - второй механизм, называемый ранней инвазией, предполагает заражение ягод до их созревания рыльца и стеблей. 	<ul style="list-style-type: none"> - налет в виде плесени мышевидного цвета покрывает зреющие ягоды, не затрагивая зеленые, содержащие большое количество кислот; - ягоды становятся вялыми, затем слегка буреют и опадают.
 <p>Оидиум (мучнистая роса) вызывается биотрофным грибом <i>Erysiphe necator</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - прикрепляется к клеткам ткани винограда с образованием первичной зародышной трубки (гаустории). - с помощью гаустории гриб извлекает необходимые для своего жизненного цикла питательные вещества из клеток винограда. 	<ul style="list-style-type: none"> - вначале в виде грязно-серого налета разной консистенции на верхней стороне листьев, некроза жилок листа, позже появляются маслянистые на ощупь пятна; - растение постепенно покрывается мягким налетом характерного серо-пепельного цвета.
 <p>Милдью (ложная мучнистая роса) вызывается иотрофным оомицетом <i>Plasmopara viticola</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - в присутствии воды зрелые спорангии выделяют зооспоры, которые заражают ткани растений; - зооспоры прорастает через межклеточные пространства, окружен жилками листа и проникает в виноград. 	<ul style="list-style-type: none"> - на листьях с верхней стороны образуются жёлтые маслянистые округлые пятна; - во влажную погоду на нижней стороне листа образуется белый мучнистый налёт; - с течением времени листья становятся красно-бурыми.

Продолжение таблицы 1

1	2	3
 <p data-bbox="268 521 628 618">Бактериальный рак вызывается биотрофным грибом <i>Agrobacterium vitis</i></p>	<p data-bbox="675 232 1070 595">- внедряется в ДНК клеток и провоцирует выработку огромного количества ауксинов и цитокининов, что приводит к быстрому разрастанию опухоли; - со временем часть куста, находящаяся выше опухоли, отмирает в результате нарушения проводимости тканей.</p>	<p data-bbox="1093 367 1474 463">- нарост в виде опухоли на многолетней древесине, однолетней лозе или корнях.</p>
 <p data-bbox="245 918 651 1043">Болезнь Пирса вызывается грамотрицательной бактерией <i>Xylella fastidiosa</i></p>	<p data-bbox="675 658 1070 987">- растения-переносчики, такие как <i>Homalodisca coagulata</i>, <i>Cicadellidae</i> и <i>Cercopoidea</i> заражают виноград, создавая биопленку во время питания соком ксилемы, в основном, водопроводящей ткани. - биопленка в сосудах ксилемы нарушает поток воды и питательных веществ по ней.</p>	<p data-bbox="1093 680 1474 1010">- внезапное усыхание большей части листовой пластинки; - сильное пожелтение, высыхание и опадение листьев; - карликовость побегов и задержка роста стеблей, а также обезвоживание гроздьев винограда.</p>

Гриб *Botrytis cinerea* обладает способностью существовать как паразит в живых зеленых тканях растений, а также как сапрофит - в мертвых или разлагающихся тканях. Эта двойственная способность позволяет ему широко распространяться в природе и обуславливает его неразборчивый характер к различным видам растений, включая виноград [14]. Проблема требует внимательного контроля и мер по защите виноградных культур от этого гриба, чтобы обеспечить качество и сохранность урожая и продукции винодельческой отрасли [15, 16]. Мучнистая роса винограда приводит к значительным потерям в производстве, так как снижает урожайность, так и качество плодов. Основной негативный эффект проявляется в снижении содержания сахара и кислотности в ягодах винограда, что влияет на его характеристики и вкусовые свойства [17].

Гриб *Erysiphe necator* извлекает гексозу, аминокислоты, витамины и другие питательные вещества из винограда, одновременно секретируя белки, которые подавляют защитные механизмы растения. Это взаимодействие позволяет грибу успешно обеспечивать себя питательными веществами и завершать свой жизненный цикл [18, 19]. Ресвератрол и его производные, такие как виниферины, являются биологически активными соединениями, которые могут участвовать в оборонительной реакции растения на патогены. Они могут обладать антиоксидантными и антигрибковыми свойствами, что делает их важными компонентами в механизмах защиты винограда от мучнистой росы. Увеличение уровня ресвератрола и виниферинов может способствовать повышению устойчивости сортов виноградной лозы к данному заболеванию и снижению его негативного воздействия на урожай и качество плодов [20].

Заражение винограда специфическим возбудителем *Agrobacterium vitis* обычно начинается через повреждения растений, особенно в результате замораживания и/или механических ран, что способствует высвобождению фенольных соединений, которые действуют как хемоаттрактанты на прикрепленные бактерии [21]. Эти соединения

активируют транскрипцию генов, продукты которых индуцируют перенос ДНК грибка в геном винограда [22].

Болезнь Пирса, вызываемая бактерией *Xylella fastidiosa*, является экономически значимым заболеванием, наносящим ущерб производству вина, столового винограда и изюма [23-25]. Виноград, зараженный бактерией *Xylella fastidiosa*, использует физические или химические барьеры после заражения, такие как тилоза. Тилоза представляет собой разрастание клеток паренхимы через пары сосудистых ямок в просвет элементов трахеи. Инициация тилозы происходит слишком медленно, чтобы ограничить распространение мобильных патогенов, таких как *Xylella fastidiosa*.

Защита растений от заболеваний

Диагностика заболеваний винограда - это сложная и ресурсозатратная задача, особенно в третьем рассмотрении определения возбудителя и определения надежных стратегий для предотвращения или сокращения экономических потерь. Однако, когда речь заходит о лечении болезней винограда, некоторые доступные подходы слишком дороги и/или непригодны [26]. Поскольку большинство разновидностей *Vitis vinifera* зависит от воздействия упомянутых патогенов, производство вина и свежего винограда в различной степени зависит от применения методов борьбы [27]. В рамках защиты винограда от патогенных микроорганизмов используются различные методы, включая культурный контроль, такой как прореживание и выращивание культуры, «холодное лечение» (выдержка растений при низких температурах для предотвращения или искоренения патогенов), химический контроль с применением контактных и системных средств, биологический контроль с применением биопестицидов для сокращения применения химических пестицидов [28].

В настоящее время комплексное управление заболеваниями, которое включает в себя комбинированные методы смягчения угрозы со стороны этих патогенов и минимизации негативного воздействия на окружающую среду и здоровье, представляет собой частично эффективный, экономически выгодный и устойчивый способ решения проблем [29]. Один из наиболее часто используемых подходов - это химический контроль, который включает в себя различные классы химических веществ, такие как соединения меди, соединения серы, дитиокарбаматы, бензимидазолы, антибиотики и другие [30-32]. Хотя эти химические вещества эффективны в борьбе с грибковыми и бактериальными патогенами, они оказывают незначительное воздействие на вирусные заболевания [33].

Современные методы борьбы с болезнями винограда обычно комбинируют различные подходы, включая генетическую устойчивость, применение биологических средств защиты и современные технологии мониторинга, чтобы обеспечить оптимальную защиту виноградных лоз и уменьшить использование химических фунгицидов. Наноматериалы и наночастицы могут быть использованы для разработки новых форм фунгицидов [34-36]. Разработка сортов винограда, которые обладают встроенной устойчивостью к определенным болезням, является одним из эффективных методов. Это позволяет снизить необходимость в химической обработке. Научные исследования в области генной инженерии могут привести к созданию виноградных сортов с улучшенной устойчивостью к болезням [37-39]. Виноградари все чаще прибегают к экологически устойчивым методам возделывания, которые способствуют снижению риска возникновения болезней, например, привлечение полезных насекомых и улучшение структуры почвы [40, 41]. Другой перспективный подход заключается в использовании биотехнологии, например, создании биопрепаратов из растительных экстрактов, которые содержат элементы устойчивости патогенов. Этот метод может стать эффективной стратегией, применимой в сельском хозяйстве в будущем. Применение биопрепаратов и микроорганизмов, таких как микробы, бактерии и грибы, которые конкурируют с патогенами болезней в почве или на растениях, помогает уменьшить распространение болезней [42-44].

Заклучение

Современные методы защиты винограда от болезней интегрируют различные подходы, такие как генетическая устойчивость, биологические средства защиты и современные технологии, с целью обеспечения оптимальной защиты и снижения зависимости от традиционных фунгицидов. Это включает в себя разработку генетически устойчивых сортов винограда, что уменьшает необходимость в химической обработке. Биологические препараты и микроорганизмы, конкурирующие с патогенами на почве и растениях, уменьшают распространение болезней. Применение нанотехнологий для создания более эффективных фунгицидов. Использование современных технологий мониторинга с датчиками и сетью Интернета вещей для реального времени контроля за состоянием виноградных лоз и окружающей средой. Экологически устойчивые методы возделывания, такие как борьба с сорняками и привлечение полезных организмов, помогают снизить риск возникновения болезней. Таким образом, современные методы борьбы с болезнями винограда включают передовые технологии и научные разработки.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан AP19680563 «Разработка биопрепарата для повышения урожайности винограда».

Литература:

- 1 Azevedo-Nogueira F., Rego C., Gonçalves H.M.R., Fortes A.M., Gramaje D., Martins-Lopes P. The road to molecular identification and detection of fungal grapevine trunk diseases. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 960289. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.960289>)
- 2 Gramaje D., Úrbez-Torres J.R., Sosnowski M.R. Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant disease*, 2018, 102(1): 12–39. (<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0512-FE>)
- 3 Muntean M.D., Drăgulinescu A.M., Tomoiagă L.L., Comşa M., Răcoare H.S., Sîrbu A.D., Chedea V. S. Fungal Grapevine Trunk Diseases in Romanian Vineyards in the Context of the International Situation. *Pathogens*, 2022, 11(9): 1006. (<https://doi.org/10.3390/pathogens11091006>)
- 4 Songy A., Fernandez O., Clément C., Larignon P., Fontaine F. Grapevine trunk diseases under thermal and water stresses. *Planta*, 2019, 249(6): 1655–1679. (<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03111-8>)
- 5 Díaz G.A., Reveglia P., Tomoiagă L.L., Chedea V.S. Editorial: Fungal pathogens causing the grapevine trunk diseases- biology and identification. *Frontiers in fungal biology*, 2023, 4: 1186166. (<https://doi.org/10.3389/ffunb.2023.1186166>)
- 6 Kulzhanov S.N., Kazybayeva S.Z., Tazhibayev T.S., Azhitaeva L.A. Yessenaliyeva M. Effect of climatic conditions on the productive and biochemical characteristics of grape varieties grown on sierozem soil. *Eurasian Journal of Soil Science*, 2022, 11 (2): 174-183 (<https://doi.org/10.18393/ejss.1057156>)
- 7 Hernandez M.N., Kc A.N.A Systematic Survey on Prevalence of Grapevine Trunk Disease Pathogens in Oregon Vineyards. *Plant disease*, 2023, 107(5): 1355–1364. (<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1220-RE>)
- 8 Niem J.M., Billones-Baaijens R., Stodart B., Savocchia S. Diversity Profiling of Grapevine Microbial Endosphere and Antagonistic Potential of Endophytic *Pseudomonas* Against Grapevine Trunk Diseases. *Frontiers in microbiology*, 2022, 11: 477. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00477>)
- 9 Bustamante M.I., Elfar K., Eskalen A. Evaluation of the Antifungal Activity of Endophytic and Rhizospheric Bacteria against Grapevine Trunk Pathogens. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2035. (<https://doi.org/10.3390/microorganisms10102035>)
- 10 Mannerucci F., D'Ambrosio G., Regina N., Schiavone D., Bruno G.L. New Potential Biological Limiters of the Main Esca-Associated Fungi in Grapevine. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2099. (<https://doi.org/10.3390/microorganisms11082099>)
- 11 Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P. Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 382. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>)

12 Pieterse C. M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 2009, 5(5): 308–316. (<https://doi.org/10.1038/nchembio.164>)

13 Robert-Seilaniantz A., Grant M., Jones, J.D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, 2011, 49, 317–343. (<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>)

14 Viret O., Keller M., Jaudzems, V.G., Cole, F.M. Botrytis cinerea Infection of Grape Flowers: Light and Electron Microscopical Studies of Infection Sites. *Phytopathology*, 2004, 94(8): 850–857. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.8.850>)

15 Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 2012, 13(4): 414–430. (<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>)

16 Rolke Y., Liu S., Quidde T., Williamson B., Schouten A., Weltring K.M., Siewers V., Tenberge K. B., Tudzynski B., Tudzynski P. Functional analysis of H₂O₂-generating systems in Botrytis cinerea: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular plant pathology*, 2004, 5(1): 17–27. (<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00201.x>)

17 Calonsec A., Cartolaro P., Poupot C., Dubourdieu D., Darriet P. (2004). Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathol.* 2004, 53: 434–445. (<https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01016.x>)

18 Qiu W., Feechan A., Dry I. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture research*, 2015, 2: 15020. (<https://doi.org/10.1038/hortres.2015.20>)

19 Gadoury D.M., Cadle-Davidson L., Wilcox W.F., Dry I.B., Seem R.C., Milgroom M.G. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology, and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular plant pathology*, 2012, 13(1): 1–16. (<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x>)

20 Dai R., Ge H., Howard S., Qiu W. Transcriptional expression of Stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet Sauvignon grapevine. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 2012, 197: 70–76. (<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.004>)

21 Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: Biology and Disease Management. *Annual review of phytopathology*, 1999, 37: 53–80. (<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.53>)

22 Burr T.J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Crown Gall of Grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the Development of Disease Control Strategies. *Plant Disease*, 1998, 82(12): 1288–1297. (<https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.12.1288>)

23 Newman K.L., Almeida R.P., Purcell A.H., Lindow S.E. Use of a green, fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and environmental microbiology*, 2003, 69(12): 7319–7327. (<https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7319-7327.2003>)

24 Roper M.C., Greve L.C., Warren J.G., Labavitch J.M., Kirkpatrick B.C. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular plant-microbe interactions*, 2007, 20(4): 411–419. (<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0411>)

25 Sun Q., Rost T.L., Matthews M.A. Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American journal of botany*, 2006, 93(11): 1567–1576. (<https://doi.org/10.3732/ajb.93.11.1567>)

26 Kamoun S., Furzer O., Jones J. D., Judelson H.S., Ali G.S. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 2015, 16(4): 413–434. (<https://doi.org/10.1111/mpp.12190>)

27 Lieth J.H., Meyer M.M., Yeo K.H., Kirkpatrick B. C. Modeling cold curing of Pierce's disease in *Vitis vinifera* 'Pinot Noir' and 'Cabernet Sauvignon' grapevines in California. *Phytopathology*, 2011, 101(12): 1492–1500. (<https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-10-0207>)

28 Pedro H., Maheswari U., Urban M., Irvine A. G., Cuzick A., McDowall M. D., Staines D. M., Kulesha E., Hammond-Kosack K. E., Kersey P. J. PhytoPath: an integrative resource for plant pathogen genomics. *Nucleic acids research*, 2016, 44: 688–693. (<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1052>)

- 29 Swinnen G., Goossens A., Pauwels L. Lessons from Domestication: Targeting Cis-Regulatory Elements for Crop Improvement. *Trends in plant science*, 2016, 21(6): 506–515. (<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.014>)
- 30 Calvo-Garrido C., Viñas I., Elmer P.A., Usall J., Teixidó N. Suppression of Botrytis cinerea on necrotic grapevine tissues by early-season applications of natural products and biological control agents. *Pest management science*, 2014, 70(4): 595–602. (<https://doi.org/10.1002/ps.3587>)
- 31 Parafati L., Vitale A., Restuccia C., Cirvilleri G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against Botrytis cinerea causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food microbiology*, 2015, 47, 85–92. (<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013>)
- 32 Almeida R.P., Daane K.M., Bell V. A., Blaisdell G.K., Cooper M.L., Herrbach E., Pietersen G. Ecology, and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 94. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094>)
- 33 Jelly N.S., Schellenbaum P., Walter B., Maillot P. Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic research*, 2012, 21(6): 1319–1327. (<https://doi.org/10.1007/s11248-012-9611-5>)
- 34 Vizitiu D.E., Sardaescu D.I., Fierascu I., Fierascu R.C., Soare L.C., Ungureanu C., Buciumeanu E.C., Guta I.C., Pandelea L.M. Grapevine Plants Management Using Natural Extracts and Phytosynthesized Silver Nanoparticles. *Materials*, 2022, 15(22): 8188. (<https://doi.org/10.3390/ma15228188>)
- 35 Michailidu J., Maťátková O., Kolouchová I., Masák J., Čejková A. Silver Nanoparticle Production Mediated by *Vitis vinifera* Cane Extract: Characterization and Antibacterial Activity Evaluation. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(3): 443. (<https://doi.org/10.3390/plants11030443>)
- 36 Miškovská A., Rabochová M., Michailidu J., Masák J., Čejková A., Lorinčík J., Maťátková O. Antibiofilm activity of silver nanoparticles biosynthesized using viticultural waste. *PloS one*, 2022, 17(8): e0272844. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272844>)
- 37 Foria S., Monte C., Testolin R., Di Gaspero G., Cipriani G. Pyramidizing resistance genes in grape: a breeding program for the selection of elite cultivars. *Acta Horti*, 2019, 1248: 549-554. (<https://doi.org/10.17660/ActaHort.2019.1248.73>)
- 38 Salotti I., Bove F., Ji T., Rossi V. Information on disease resistance patterns of grape varieties may improve disease management. *Frontiers in plant science*, 2022, 13: 1017658. (<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1017658>)
- 39 Di Gaspero G., Cattonaro F. Application of genomics to grapevine improvement. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2010, 16: 122–130. (<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00072.x>)
- 40 Giffard B., Winter S., Guidoni S., et al. Vineyard Management and Its Impacts on Soil Biodiversity, Functions, and Ecosystem Services. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2022, 10: 850272. (<https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850272>)
- 41 Jonas J.L., Wilson G. W.T., White P.M., Joern A. Consumption of mycorrhizal and saprophytic fungi by Collembola in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(10): 2594–2602. (<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.004>)
- 42 Zhang H., Godana E. A., Sui Y., Yang Q., Zhang X., Zhao L. Biological control as an alternative to synthetic fungicides for the management of grey and blue mould diseases of table grapes: a review. *Critical reviews in microbiology*, 2020, 46(4): 450–462. (<https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1794793>)
- 43 Rotolo C., De Miccolis Angelini R.M., Dongiovanni C., Pollastro S., Fumarola G., Di Carolo M., Perrelli D., Natale P., Faretra F. Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of Botrytis cinerea in table grape vineyards. *Pest management science*, 2018, 74(3): 715–725. (<https://doi.org/10.1002/ps.4767>)
- Esteves M., Lage P., Sousa J., Centeno F., de Fátima Teixeira M., Tenreiro R., Mendes-Ferreira A. Biocontrol potential of wine yeasts against four grape phytopathogenic fungi disclosed by time-course monitoring of inhibitory activities. *Frontiers in microbiology*, 2023, 14, 1146065. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1146065>)

IRSTI: 68.41

A.M. ISIMOV*, G.B. ADMANOVA, A.T. SARZHIGITOVA, N.K. KEMALOVA,
B. BAKY TZHANKYZY
K. Zhubanov Aktobe Regional University, Aktobe, Kazakhstan
*e-mail: knk17@bk.ru

PYTHON AS A TOOL FOR GENOME-SCALE METABOLIC MODEL RECONSTRUCTION AND ANALYSIS

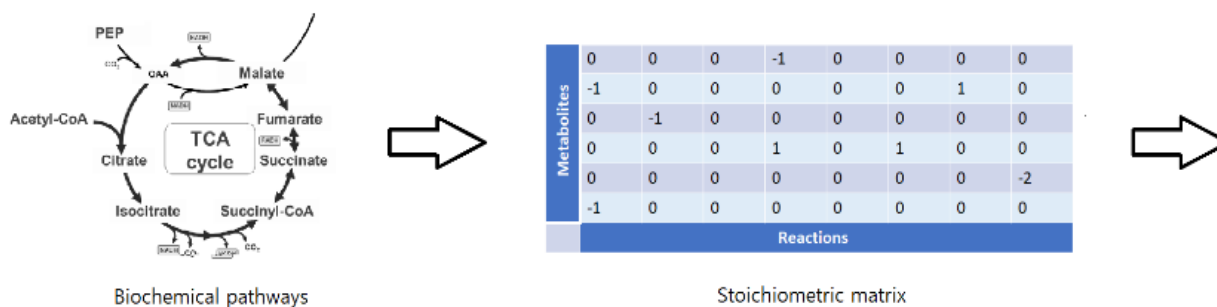
doi:10.53729/MV-AS.2023.04.03

Abstract

The cost reduction of high-throughput technologies has led to the development of data analysis methods that deal with the increasing availability of omics datasets. Constraint-based genome-scale metabolic modeling is an example of such a method. It uses omics data and biochemical networks, a mechanistic framework to combine omics data, to describe steady-state metabolic flux distributions. Therefore, a system of mass balance equations is created that can be solved via linear programming. To date, most software for constraint-based genome-scale modeling has relied on MATLAB, a popular proprietary programming language. However, Matlab has issues when dealing with the integration of omics datasets and modeling complex biological processes beyond metabolism. In contrast, Python, an object-oriented open-source programming language, is a better choice for solving these issues. It has a relatively easy syntax, offers an extensive community, and allows seamless integration of omics datasets. Owing to these factors, Python is a good emerging tool for constraint-based genome-scale metabolic modeling. This review aims to provide an introduction and systematic overview of Python-based tools for constraint-based genome-scale metabolic modeling. We installed, checked the documentation, and tried to use each tool described in the review. We grouped each tool into one of the three categories (GEM reconstruction and maintenance, phenotype simulation, or visualization software) and provided detailed tool and concept explanations when necessary.

Keywords: constraint-based modeling, genome-scale metabolic model, Python, balance flux analysis, in silico modeling.

The emergence and subsequent drop in the cost of high-throughput omics technologies have led to the development of various data analysis methods [1]. The applications of these methods allowed for the characterization of cells not as separate entities but as a system of interacting biological components. Constraint-based genome-scale metabolic modeling uses omics data (primarily genome sequences) and biochemical networks, a mechanistic framework, to combine omics data and answer relevant biological questions about genotype-phenotype metabolic relationships [2]. A biochemical network can be seen as a flow network where metabolites flow inside the network in the same way as liquids pass through a pipe. Thereafter, these biochemical networks are converted into a mathematical format (called a stoichiometric matrix) for computational purposes (Figure 1).



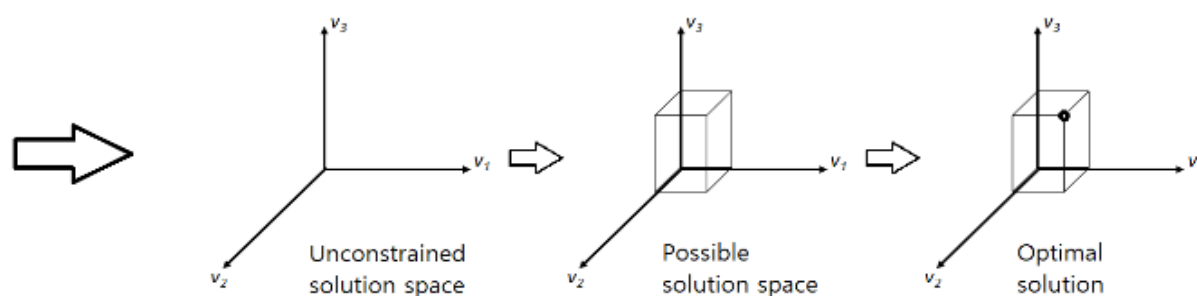


Figure 1 - From biochemical pathways to optimal solution

The stoichiometric matrix represents a structured and systematic knowledge-base of biochemical transformations inside a specific target organism. It is used to calculate steady-state flux distributions that satisfy an objective function, a user-defined reaction using linear optimization. In the stoichiometric matrix S of size $m \times n$, each row of the matrix belongs to one unique metabolite (for a total of m metabolites), and each column belongs to a separate reaction (for a total of n reactions) [3]. Each entry in the column is the stoichiometric coefficient of reaction metabolites. Produced metabolites have positive coefficients, whereas consumed metabolites have negative coefficients. For each metabolite that does not participate in a reaction, a stoichiometric coefficient of zero is used. Thus, S is a sparse matrix because the reactions commonly involve a few metabolites. The flow (flux) which goes through all reactions is shown as vector v of the n length. Metabolite concentrations are represented as vector x of length of n . The system of mass balance equations at steady state ($dx/dt = 0$) is provided below:

$$Sv = 0$$

The null space of S is any value of v that solves the equation. For any realistic stoichiometric matrix, the number of unknown variables (reactions) is greater than the number of equations (metabolites); thus, there is no unique optimization solution present (unconstrained solution space). Hence, constraints are imposed to decrease the maximum number of possible solutions to maintain only phenotypically feasible states inside the possible solution space. Optimizing objective function usually involves finding a single optimal solution on the edge of the possible solution space (shown as a circular point) [4].

The main constraints are related to the cell genotype, environment, and physico-chemical laws [2]. Cell genotype constraints are imposed by including reactions that are supported by genomic evidence. For reactions already included in the model, genetic knockouts can be constrained by setting the associated reaction bounds to zero. Environmental constraints can be imposed by constraining the uptake rates of growth-limiting substrates (such as carbon or electron sources). Physico-chemical laws include a steady-state mass-balance constraint, indicating that the net production of every metabolite should equal its net consumption rate. In addition, enzymes can be constrained by their capacities, such as V_{max} (reaction maximal velocity). Finally, reaction reversibility is determined by biochemical characterization of the enzyme or network properties (such as no free ATP production).

Despite common misconceptions, genome-scale metabolic modeling does not impose constraints on protein, mRNA, or metabolite concentrations, nor do detailed kinetic parameters impose constraints in standard models. The inclusion of additional constraints either further constrains the solution space or changes the scope from a static state to kinetic modeling, or metabolism to other cellular processes (such as transcriptional regulation or structural protein properties) [2]. More advanced constraints include modifying reaction bounds based on gene and

protein expression data, metabolite concentrations, and kinetic parameters, either by adjusting reaction bounds or knocking out the reactions [5].

Constraint-based methods rely on linear programming, a mathematical optimization technique, to solve $Sv = 0$ equation. Linear programming is used to reduce the mathematical complexity and computational cost associated with biochemical networks, which tend to have thousands of metabolites and reactions. Flux balance analysis (FBA) is a popular method based on the assumption that cells strive to achieve a metabolic objective, usually growth rate maximization [4]. FBA solves the $Sv = 0$ equation by imposing constraints on the upper and lower bounds of v and providing a linear combination of fluxes as an objective function, a user-defined reaction. FBA determines the flux distribution of a biochemical network that satisfies the objective function. Flux variability analysis (FVA) is another constraint-based method that considers the maximum and minimum flux values of each individual reaction inside the network when the objective function is set to the maximum value [6]. Finally, Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling is a technique that computes multiple flux distributions to calculate the probability distribution of every individual flux within the biochemical network. In contrast to previous methods, this method is unbiased because no assumption of optimal growth is necessary.

Programming languages can be a tool to provide code-based user instructions that are interpreted and run by the central processing unit [7]. They have been used for various tasks, including modeling workflows. The COntstraint-Based Reconstruction and Analysis (COBRA) toolbox, a leading software of constraint-based methods for genome-scale metabolic modeling, has been implemented in MATLAB, a popular proprietary programming language. However, owing to technological advancements in high-throughput technologies, the limitations of MATLAB have become apparent. In addition to proprietary nature, there are issues when dealing with the integration of omics datasets and in modeling complex biological processes beyond metabolism. In addition, Python, an object-oriented open-source programming language, is a better choice to solve these issues [8]. It has a relatively easy syntax, which lowers the threshold required to learn the language. Furthermore, Python offers extensive community support, which is partially due to its open-source origin. In summary, these factors have made Python an emerging tool for genome-scale metabolic modeling [9].

Genome-scale metabolic models (GEMs) have been used for various purposes, including drug discovery, valuable compound production, enzyme function prediction, pan-reactome analysis, and multicellular interactions.

In drug discovery, GEMs have been used to study cancer cell metabolic auxotrophies. For example, GEM was coupled with transcriptomic data to predict knockout phenotypes to find cytostatic drug targets that block cancer cell growth but do not affect ATP generation and growth of 'healthy' cells [10]. In another study, potential drug targets for 27 HHC patient-specific models were created using immunohistochemical proteomic data. Drug targets were selected using the essential metabolite concept, an idea that the potential lethality of reaction knockout is linked to a particular metabolite. Finally, the effects of suspected mutated oncometabolites (fumarate hydratase, succinate dehydrogenase, and isocitrate dehydrogenases) were studied using MCMC sampling generated flux distributions [11].

GEMs have also been used to study various valuable compounds using metabolic engineering strategies. A few examples of applications for metabolic engineering include the production of L-valine, lycopene, lactic acid, and succinic acid using *Escherichia coli* [12–15]. With the increased genome availability, the number of organisms for which genome-scale metabolic (GSM), has been reconstructed also increased, moving away from the model to less studied organisms. Recently, GSM has been applied for the metabolic engineering of methanotrophs, bacteria that utilize methane as the primary energy and carbon source. One study reported that putrescine was produced by first expressing linear pathway ornithine decarboxylase genes and then using GEM to identify gene knockout strategies to improve putrescine titer. In another study, a similar strategy was used to produce 2,3-butanediol [16].

GEMs have also been used to predict various enzyme functions. For example, GEM allows the identification of essential genes that are believed to be unessential in *Escherichia coli*. These predictions were made possible due to the presence of previously unidentified reactions that made a nonessential gene essential for in silico knockout. Among the unessential genes, *gltA*, *argD*, and *aspC* were selected for further experimental validation because sequence homology analysis identified high-confidence candidate isozymes. In another example, enzyme promiscuity was studied by linking knockout studies with GEM [17]. Selected target genes were knocked out, whereas their replacer genes were not. Thereafter, GEM was used to mechanistically explain the flux distributions of enzymes encoded by replacer genes. Among target-replacer gene pairs, the predicted *pdxB-thiG* gene pair was proven experimentally.

GEMs have also been used to analyze pan-reactome. In one study, hierarchical clustering of 24 species-specific *Penicillium* GEMs provided information regarding secondary metabolite biosynthetic pathways that differentiated various metabolic clades. In another study, pan-reactome and accessory reactome analyses of 410 *Salmonella* strains were performed [18]. GEM simulations under different nutrient uptakes helped to identify various capabilities and optimal growth environments for *Salmonella* strains.

Finally, GEMs can be used to model interactions between different cells, tissues, and organisms, including microbiome simulations. For example, GEM was employed to model the competitive behavior between *Geobacter* and *Rhodospirillum rubrum*, an acetate-oxidizing Fe(III)-reducing bacteria that live in anoxic subsurface environments [19]. The model helped conclude that *Rhodospirillum rubrum* would be the dominant strain provided enough ammonium is present in the medium. In addition, *Geobacter* became the dominant strain when high acetate concentrations were added during in situ bioremediation of uranium-contaminated groundwater. In another example, CASINO, a CSM-based algorithm, was used to model the effect of diet on the gut microbiome and its dietary interactions [20]. CASINO was able to predict interactions between the diet-microbiota-host axis in 45 overweight and obese patients. In addition, the metabolic capacities of microbes in the lumens of overweight and obese patients were studied. The study indicated a significant change in short-chain fatty acids and amino acids following changes in dietary habits.

This review aims to provide an introduction and systematic overview of Python-based tools used for constraint-based genome-scale metabolic modeling. We installed, checked the documentation, and tried to use each tool described in the review. Based on the primary functions, we divided each tool into three categories: GEM reconstruction and maintenance, phenotype simulation, or visualization software.

GEM reconstruction and maintenance

The GEM reconstruction process consists of four main steps: the creation of a draft reconstruction, conversion into a mathematical model, collection of biological information regarding the organism of interest, and model refinement based on organism-specific information. The first two steps are based on the top-bottom approach when the annotated genes of the organism of interest are used to assign and include corresponding enzymatic reactions into the mathematical model. These steps can be automated similar to that of genome annotation pipelines. The next two steps require extensive literature review and specific knowledge regarding the organism of interest and are performed manually. Therefore, the quality of reconstruction depends on the quality and amount of organism-specific information [21].

Reconstructed GEM should include information regarding each reaction's stoichiometry and directionality, metabolite formulas, substrate and cofactor usage, and intracellular pH. Furthermore, GEM should include spontaneous and transport reactions to allow in silico growth rate predictions, biomass constitution and its fractional contribution to overall cellular biomass, and growth-associated ATP maintenance (GAM). If a biochemical network has missing reactions, gapfilling, a mixed-integer linear programming method to determine the smallest number of reactions to fill gaps and produce simulation-ready GEM, is performed. The model refinement step was performed to verify the draft mathematical model by quantitatively comparing predicted in silico growth rates with the experimental data in a chemically defined growth medium. Additional

information regarding the GEM reconstruction process can be found in a published protocol [3]. Good software for GEM reconstruction should allow fast generation of the draft metabolic model, easy integration of organism-specific data, and organized track of changes during model refinement (Table 1).

CarveMe is a tool that allows automatic generation of draft and simulation-ready GEMs from the database of reference models. CarveMe uses BiGG Models as the source database for metabolic reactions [22]. CarveMe works by reducing the number of reactions in the initial reference model; therefore, only reactions with some evidence of presence (such as genome annotation) are left in the model. Subsequently, automatic gap-filling was performed to produce a simulation-ready-draft GEM. CarveMe only allows prokaryotic GEM reconstruction with the function of selecting a gram-positive or gram-negative template.

PythonCyc is a Python application program interface to Pathway Tools, a popular bioinformatics software package for pathway and genome informatics and systems biology [23]. The scope of Pathway tools goes beyond constraint-based modeling; however, its genome-scale modeling component can be accessed via MetaFlux. MetaFlux uses the Pathway/Genome Database (PGDB) and MetaCyc databases and the subsequent automatic gap-filling to generate draft simulation-ready GEMs.

Gsmotutils is another methodology suggested for the continuous management of genome-scale models, especially for synthetic biotechnology and industrial system applications [24]. The authors of Gsmotutils claim that the main difference between Gsmotutils and Memote is the reduced redundancy in the model versions of Gsmotutils, which is achieved using design deltas, a set of changes that are necessary to convert a wild-type strain to an industrially relevant strain.

Table 1- Detailed description of GEM reconstruction tools

Name	Function	Input	Output	Repository or equivalent	Docum. or equivalent	Sptd. Python Ver.
CarveMe	Reconstruction of organism-specific model	FASTA file or NCBI id	Draft model in XML format	https://github.com/cdanielmachado/carveme	https://carveme.readthedocs.io	2.7 and 3.6
PythonCyc	Model reconstruction	No specific input required, but organism must be available in Pathway Tools database	Draft model in XML format	https://github.com/eco-cyc/PythonCyc	https://pythoncyc.readthedocs.io	2.7 and 3.5+
Gsmotutils	Test-driven continuous integration of data for industrial systems and synthetic biology applications	Draft model in XML format	Updated model in XML format	https://github.com/SBRCNottingham/gsmotutils	https://gsmotutils.readthedocs.io	2.7+ and 3.6+

Note: Cells with hyphen sign in the table indicate that there was either no information available to fill the cell or the tool lacks the feature that should be filled in the cell. Python 2.x refers to Python 2, Python 3.x refers to Python 3, + refers to Python version releases above the number next to which + sign is located

The Cobra toolbox is a set of constraint-based modeling methods for GEM manipulation (Table 2). It is a popular package for GEM manipulation, which is reported to be used by 60% of the COBRA research community [2]. COBRAPy is a Python implementation of the Cobra toolbox. COBRAPy allows model reconstruction, in silico simulations, and analytical methods. In silico

simulations were based on a flux-balance analysis. In addition to regular FBA, COBRApy has parsimonious FBA (pFBA), flux variability analysis (FVA), and loopless FBA. pFBA minimizes the total flux inside the biochemical network while satisfying the model constraints and solving the objective function. The underlying assumption is that under growth pressure, there is a selection procedure for strains that can process the growth substrate in the most rapid and efficient manner, while using the minimum amount of enzyme. FVA is a computational tool that allows computation of the lower and upper bounds of individual reaction fluxes within a biochemical network. This allows us to assess whether an alternative optimal solution for each reaction of interest exists. Loopless FBA removes thermodynamically infeasible loops, a set of reactions that lead to unrealistically high flux values and *in silico* growth rates. Analytical methods include production envelopes, flux sampling, and medium manipulation. Production envelopes, or phenotypic phase planes, calculate the trade-off between flux towards *in silico* growth rate and desired product, which appears useful in designing metabolic engineering strategies. Flux sampling allows us to obtain the mean flux values for individual reactions within the biochemical network. This may allow the comparison of the flux values of individual reactions under different environmental conditions [8].

PSAMM is another set of constraint-based modeling methods for GEM manipulation. PSAMM offers the same functionality as COBRApy. In addition, it extends COBRApy's functionality by offering version control, which is an automated comparison of model versions during model reconstruction. Version control is performed by checking model parameters such as reaction stoichiometry, formula consistency, charge consistency, flux consistency checking, and gapcheck, and identification of metabolites that cannot carry any flux inside the metabolic network. PSAMM's official documentation appears to be more user-friendly than COBRApy's, with tutorials describing troubleshooting of common problems. PSAMM exports models that are interconvertible with COBRApy, thus allowing the integration of these two software [25].

PyFBA is a similar set of constraint-based methods for GEM manipulation. PyFBA has only basic functions, such as model manipulation, basic FBA analysis, and gapfilling. The documentation appears to be incomplete, as some links could not be opened when writing this review. Furthermore, prior installation of the Model SEED database is necessary.

Cameo is a Python library that aims to help in rational strain design for metabolic engineering purposes. Cameo is a modular framework comprising four main modules:

- 1) Model simulation and analysis based on FBA;
- 2) Prediction of gene knockout strategies using evolutionary OptGene or linear OptKnock algorithms;
- 3) Prediction of expression modulation targets, reactions, or genes that can be down- or over-regulated to satisfy a biological objective such as excretion of the product of interest;
- 4) Prediction of the shortest possible heterologous metabolic pathways to be introduced. Heterologous reactions are searched using a universal reaction database model that combines reactions from different sources (BRENDA, BIGG, RHEA, KEGG) [26-28].

Cameo has detailed documentation that can be used by both experienced and unexperienced programmers. Developers may use Cameo to customize analysis workflows or develop new algorithms. Unexperienced programmers may refer to strain design using a high-level interface [20]. Cameo was built on COBRApy and is compatible with it.

There are also several specific modeling tools that use one or a few constraint-based methods. These tools can be used if general tools cannot be used or further, if a more detailed analysis is necessary. In general, specific tools are simpler, and their documentation is easier to understand.

GAPSLIT is a Python implementation for the random sampling of constraint-based models. GAPSLIT targets under-sampled regions of the flux solution space, resulting in a more uniform sampling coverage of models. GAPSLIT can be used to compare GEMs under different environmental conditions (such as growth on different carbon sources) to obtain mean flux values for individual reactions.

FastSL-py is an algorithm for the identification of higher-order synthetic lethals in GEMs. Higher synthetic lethals are gene or reaction sets that can inhibit the growth rate of an organism only when all of them are inactivated. This may allow for the identification of unexpected genetic alterations and combinatorial drug targets.

CoBAMP is a modular framework for network analysis of GEMs. CoBAMP implements two types of network analysis: elementary flux modes (EFMs) and minimal cut sets (MCSs). EFMs are minimal, non-decomposable, and have steady-state pathways within the metabolic network. EFM can be used in metabolic engineering to identify the shortest biochemical pathways that generate the products of interest. MCSs are concepts related to EFMs [29].

Table 2- Detailed description of static modelling tools

Name	Function	Input	Output	Repository or equivalent	Docum. or equivalent	Sptd. Python Ver.
1	2	3	4	5	6	7
Cobra toolbox	Model reconstruction, manipulation, and analysis	New models can be built from scratch, supports models in XML, JSON, YAML, MATLAB, and Pickle formats	Multiple outputs are possible depending on researcher's purpose	https://github.com/opencobra/cobra-py	https://cobrapy.readthedocs.io	3.x
PSAMM	Model reconstruction, maintenance and analysis	Supports models in YAML (preferred format), XML, JSON and Excel formats	Multiple outputs are possible depending on researcher's purpose	https://github.com/zhanglab/psamm , https://github.com/zhanglab/psamm-import	https://psamm.readthedocs.io	2.7 and 3.x
PyFBA	Model reconstruction, gapfilling, and flux-balance-analysis	Model in SML format	Multiple outputs are possible depending on researcher's purpose	http://linsalrob.github.io/PyFBA/	http://linsalrob.github.io/PyFBA	2.7 and greater
Cameo	Metabolic engineering workflows for rational strain design	Supports models in XML, JSON, Pickle formats, possible to download models from BiGG Models database	Multiple outputs are possible depending on researcher's purpose	https://github.com/biosustain/cameo	https://cameo.bio	3.x
GAPSPLIT	Random sampling	Model in XML format, number of samples to generate	List of randomly sampled individual fluxes	https://github.com/jensenlab/gapsplit	-	3.x

Table 2 continued

1	2	3	4	5	6	7
FastSL-py	Efficient identification of synthetic lethal gene and/or reaction sets	Model in MAT format	List of genes directory in CSV format	https://github.com/RamanLab/FastSL-py	https://fastsl-py.readthedocs.io	3.5 and 3.6
CoBAMP	Pathway analysis concepts such as elementary flux modes and minimal cut sets	Model in XML format	Flux coefficients in the form of Python dictionaries	https://github.com/BioSystemsUM/cobamp	https://cobamp.readthedocs.io	3.x
Note: Cells with hyphen sign in the table indicate that there was either no information available to fill the cell or the tool lacks the feature that should be filled in the cell. Python 2.x refers to Python 2, Python 3.x refers to Python 3, + refers to Python version releases above the number next to which + sign is located						

Context-specific model generation

Context-specific GEMs can be viewed as the next layer of constraints applied to GEMs, in addition to regular constraints. These additional constraints usually involve multi-omics data integration, such as transcriptome-, proteome-, metabolome-, or fluxome-based data. Context-specific GEMs have been shown to describe better flux distributions in cells and tissues, and specific conditions such as different stages of cell development [30] (Table 3).

Ssbio is a pipeline for the creation of genome-scale models with protein structures (GEM-PROs). GEM-PROs are an extension of regular GEMs that add protein-related data to GEMs, converting them into protein-related data knowledge bases. The annotation is performed by mapping protein IDs from the model to biochemical databases, such as KEGG or UniProt. The protein-related data should include domain architecture, protein fold family, stoichiometry, or structural information. Homology modeling is possible for proteins with no available structure. GEM-PROs can be used in different applications, depending on the researcher's interest. One example is to investigate how changes in protein structure may affect cellular metabolism. Ssbio has detailed documentation with step-by-step tutorials both for GEM-PRO reconstruction and the use of GEM-PROs that have already been reconstructed. Because GEM-PRO reconstruction requires the collection of extensive protein data to date, only GEM-PRO for *Escherichia coli* has been reconstructed.

Metabolites2Network is a simple Python code that assists in interpreting metabolic profiles by connecting metabolites to their corresponding metabolic reactions with the GEMs [31]. Metabolites2Network uses the ChEBI-ontology-based method for metabolite mapping, which allows mapping despite variations in identifier and annotation information between the database and GEMs. The tool has been used to link lipidomic datasets to Recon2.2, a high-quality human GEM.

RIPTiDE is a simple tool that creates context-specific bacterial GEMs to study adaptive evolution, a driving force for microbial interactions, and disease manifestation. To achieve this, RIPTiDE integrates pFBA with transcriptomic data [4]. The tool correlates the median flux values with the available data and minimizes the flux through reactions with low transcript abundances. This allows the identification of energy-efficient biochemical pathways that are active in cells. RIPTiDE has been used to identify active context-specific pathways in *Escherichia coli* str. K-12, without prior knowledge of medium composition. Furthermore, the tool correctly predicted the growth rates of *Escherichia coli* str. K-12 derived from clindamycin-treated mouse cecum.

pyTFA is a Python implementation of thermodynamics-based flux analysis. It integrates quantitative metabolomics data, such as metabolite concentrations and Gibbs free energies, to

thermodynamically constrain the reaction directionality in GEMs. These thermodynamic constraints are then combined with FBA into the same mathematical problem. pyTFA models were built on COBRAPy models with three additional layers. The first layer contains information regarding the concentration of each metabolite in the compartment, ionic strength, pH, and other properties. The second layer contains metabolites with SeedID to obtain thermodynamic values from the databases. The third layer contained annotation information about each metabolite. The tool has been used to constrain both reduced and complete *Escherichia coli* GEM (iJO1366). pyTFA has well-written documentation with a simple example script.

Table 3- Detailed description of context-specific model generation tools

Name	Function	Input	Output	Repository or equivalent	Docum. or equivalent	Sptd. Python Ver.
ssbio	Knowledgebase that connects models with protein-related structural data	Gene/protein IDs, protein sequences if necessary, model in XML or MAT format	GEM-PRO model in XML format	https://github.com/SBRG/ssbio	https://ssbio.readthedocs.io ; https://github.com/SBRG/GEMPro	3.x
Metabolites 2Network	Matching lipids from lipidomics datasets with metabolites in metabolic networks based on ChEBI ontology	Metabolomic dataset of metabolites present in model of interest in JSON or TSV format (example how to make the dataset is provided)	List of matched metabolites in TSV or JSON format	https://forge.mia.inra.fr/metexplore/metabolomics2network	-	3.4
RIPTiDe	Flux minimization based on transcriptomics data integration for bacterial models	Model in XML format; transcriptome data in TSV format	Modified model in XML format with reduced solution space which should provide more precise flux distribution	https://github.com/mjenior/riptide	https://github.com/mjenior/riptide	3.6+
pyTFA	Integration of quantitative metabolomics data	Model in XML format	Thermodynamically-constrained model in XML format	https://github.com/EPFL-LCSB/pytfa	https://pytfa.readthedocs.io	3.5

Note: Cells with hyphen sign in the table indicate that there was either no information available to fill the cell or the tool lacks the feature that should be filled in the cell. Python 2.x refers to Python 2, Python 3.x refers to Python 3, + refer to Python version releases above the number next to which + sign is located

Enzyme-cost included context-specific model generation

The predictive capability of GEM is based on a relatively rough description of biomass composition, which only considers growth-dependent changes occurring in cellular metabolism. The energetic constraints imposed by functional macromolecules on biomass composition are

commonly omitted. However, there is some evidence that at least at the scale of individual biochemical pathways, enzymes, and other functional macromolecules drain a significant amount of cellular resources affecting pathway regulation patterns. Therefore, it is expected that the introduction of enzyme-related biosynthetic costs into the biomass equation would improve the outcomes of *in silico* predictions generated by GEMs (Table 4).

There are two conceptually similar yet independent approaches that solve this issue: resource balance analysis (RBA) and metabolism and macromolecular expression (ME) [32]. The principle behind these approaches is that enzymes and other functional macromolecules are added as pseudo-metabolites to biomass composition, and maximum enzyme capacity, which is the product of enzyme abundance and its turnover number, is also added as an additional constraint on metabolic flux distribution. Both approaches can be viewed as an extension of regular static steady-state modeling; however, they cannot be solved using linear optimization algorithms. Due to the additional constraints and the need for nonlinear approximation, both approaches result in increased model size and complexity.

RBAPy is a Python implementation of the RBA framework. RBA model reconstruction is complicated; however, RBAPy provides detailed documentation. To start model reconstruction, the Uniprot organism taxon ID should be entered to generate helper files. Inside these helper files, the following information should be indicated: metabolite compartments, consumed or produced metabolic biomass precursors, and molecular machinery information such as tRNAs, average chaperone composition, and ribosome composition. Furthermore, additional cofactor information (name, subunit structure, and stoichiometry of cofactors per protein) should be provided for each unambiguous protein. The further calibration of the draft model is performed by the following steps:

- 1) Estimation of protein percentage per cellular compartment, which requires proteomic data for cells at different growth rates.
- 2) Estimation of the proportion of non-enzymatic proteins (maintenance or housekeeping proteins) per cellular compartment, which can be estimated from proteomic data for cells at different growth rates.
- 3) Estimation of the catalytic rates of enzymes, which requires proteomic and additional fluxomic data.

If *de novo* model reconstruction is not possible, RBAPy allows the use and modification of already reconstructed models. To date, RBA models have already been developed for the following model organisms: wild-type *Bacillus subtilis* 168, wild-type *Escherichia coli* K-12, and engineered CO₂-fixing *Escherichia coli* K-12 strain. Finally, RBAPy has embedded integration with popular visualization software such as Escher and Proteomaps.

COBRAME is a COBRAPy extension that aims to construct ME models with decreased size and complexity [33]. ME-models predict optimal macromolecular expression, the amount of individual proteins, nucleotides, and cofactors required for optimal growth. To achieve this, COBRAME couples individual reaction fluxes to the synthesis of related macromolecules. The synthesis of macromolecules requires detailed information about transcription, translation, tRNA charging, and protein complex formation reactions, which require detailed information (such as name, stoichiometry, RNA type, sequence, and coupled sub-reactions). To date, only *E. coli* K-12 MG1655 and iJL1678b strains have been constructed. COBRAME does provide detailed documentation for *de novo* model reconstruction; however, it should be noted that this protocol still requires programming experience and the availability of proteomic data.

Table 4- Detailed description of enzyme-cost included context-specific model generation tools

Name	Function	Input	Output	Repository or equivalent	Docum. or equivalent	Sptd. Python Ver.
RBapy	Creation and simulation of bacterial RBA models by integration macromolecular composition of the cell	Annotated model in XML format, Uniprot organism ID required for automatic download and integration of macromolecular composition data into the model	Constrained RBA model in XML format	https://sysbioinra.github.io/RBapy	https://sysbioinra.github.io/RBapy/usage.html	2.x and 3.x
COBRAME	Software framework for generation of ME-models by integrating proteome biosynthetic costs	No specific input required, ME model can be built from scratch	ME models in JSON or pickle format	https://github.com/SBRG/cobrame	https://cobrame.readthedocs.io	2.7+ and 3.5+

Note: Cells with hyphen sign in the table indicate that there was either no information available to fill the cell or the tool lacks the feature that should be filled in the cell. Python 2.x refers to Python 2, Python 3.x refers to Python 3, + refers to Python version releases above the number next to which + sign is located

Dynamic modelling

Although genome-scale metabolic modeling can be used to predict steady-state metabolism, it cannot be used to describe growth under changing extracellular environments, such as batch culture. In contrast, dynamic modeling frameworks account for transient states when metabolite concentrations vary over time, and steady states when provided with the initial metabolite concentration. Dynamic modeling requires additional constraints, making it computationally complex. It relies on parameterized sets of nonlinear ordinary differential equations (ODEs), which predict the time trajectories of the selected processes and provide outputs that can be integrated with experimental data for multiple time points when available. In silico predictions are based on kinetic rate laws, whereas the final flux values are acquired using equilibrium metabolite concentrations. As a result, ODEs require input values for kinetic parameters and experimental metabolite concentrations. Kinetic parameters can be obtained from a literature review or databases. Two significant databases are BRENDA and SABIO-RK. BRENDA contains manually and automatically extracted enzyme-specific data from primary scientific literature [16]. SABIO-RK contains information regarding enzyme-related biochemical reactions and pathways, including metabolites, cellular locations, and other enzyme-related information. The enzyme-related information that can be found in databases includes K_M (Michaelis constant), IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), k_{cat} (turnover number), K_i (dissociation constant), specific enzyme activity, and V_{max} (reaction maximal velocity). A potential limitation of dynamic modeling is that such detailed models exist only for few pathways in model organisms, such as *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* since their kinetic properties have been well characterized [34].

DMPy is a pipeline for generating a dynamic FBA model without enzyme cost considerations (Table 5). It uses a biochemical network as an input to look for kinetic rates to produce a mathematical model. Kinetic rates are searched in online databases such as BRENDA, eQuilibrator, and SABIO-RK [16]. For rates that are incompatible, incomplete, or unavailable, parameter balancing is used. Parameter balancing is based on Bayesian parameter estimation and uses thermodynamic dependencies between different biochemical quantities to provide parameter approximation from the available kinetic data. It considers changing measurement conditions (such as temperature and pH) and uses data augmentation with prior distributions to approximate

kinetic values in realistic ranges. However, approximately 80% of good estimates are required to accurately perform dynamic modeling. Furthermore, GEMs should be properly annotated. For metabolites, correct identifiers for Chebi, Inchi, Kegg Compound, and Pubchem substance identifiers are required, whereas, for reactions, Kegg Reaction, Reactome, Rhea, or Sabio-RK reaction identifiers are necessary. Finally, DMPy documentation seems technical. The scripts provided by DMPy appear to be difficult to modify for the users, implying that replications of script simulations are a more viable option than reconstruction of new dynamic FBA models. To date, the following DMPy models have been reconstructed: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Lactococcus lactis*.

DynamicME is a COBRAme extension that uses time-course (fed)batch culture data for time-course simulations of ME models. The tool has been used to predict time-course *Escherichia coli* iJL1678b's substrate utilization hierarchy on a mixed carbon substrate medium (acetate, galactose, glucose, glycerol, L-lactate, and maltose). This was done by generating an ensemble of models that utilize different substrates and have rate constants perturbed. Thereafter, models were analyzed by identifying archetypical time-course metabolite concentration profiles. In addition, constraints on protein abundance when the current protein abundance depends on abundance from the growth on previous substrate (protein "inertia") changed metabolic responses to environmental fluctuations, such as lowered oxidative phosphorylation and increased substrate-level phosphorylation. DynamicME's documentation appears to be incomplete. It has one tutorial that provides an example of how to use the scripts described in the original publication. The analysis can be performed by modifying the example scripts, although some programming experience may be necessary. The tool was implemented in Python 2.7, which is currently out of date.

Table 5- Detailed description of dynamic modelling tools

Name	Function	Input	Output	Repository or equivalent	Docum. or equivalent	Sptd. Python Ver.
DMPy	Pipeline for the generation of kinetic metabolic models by searching for reaction rates	Model in XML format, organism name	Constrained model in XML format	https://github.com/wurzburg/DMPy	-	2.7
DynamicME	Dynamic evaluation of cell metabolism and protein expression	ME models in JSON or pickle format	Analysis results such as time-based metabolite concentration profiles according to repository script	https://github.com/SBRG/dynamicme	-	2.7
Note: Cells with hyphen sign in the table indicate that there was either no information available to fill the cell or the tool lacks the feature that should be filled in the cell						

Concluding remarks

This review provides an introduction and systematic overview of Python-based tools for constraint-based genome-scale metabolic modeling. It also illustrates the extent to which Python can be used in areas such as GEM reconstruction and maintenance, phenotype simulation, and visualization. With regard to GEM reconstruction, some popular GEM reconstruction tools such as ModelSEED or Kbase cannot be accessed via Python. Nevertheless, the development of GEM maintenance software such as Memote and Gsmotutils can be seen as a significant milestone, as high-quality GEM reconstruction using Python became possible with the appearance of these

quality control tools. Python-based phenotype simulation tools are extensively used for single-cell organisms. However, ensemble-level-based GEM modeling is still at an emerging stage. Two areas in which Python can be used in the future are the microbiome and human disease. In addition, integration with other modeling approaches besides kinetic modeling, such as transcriptomic networks, may be explored. Finally, it is worth mentioning that if the required functionality is not available using Python, available tools written in other programming languages or standalone software with a graphical interface can be used.

References:

- 1 Schwarze K., Buchanan J., Fermont J.M., Dreau H., Tilley M.W., Taylor J.M., ... & Wordsworth, S. The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in the United Kingdom. *Genetics in Medicine*, 2020, 22(1), 85-94 (doi: 10.1038/s41436-019-0618-7)
- 2 Bordbar A., Monk J. M., King Z. A., & Palsson, B. O. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(2), 107-120 (doi: 10.1038/nrg3643)
- 3 Thiele I., & Palsson B. Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 2010, 5(1), 93-121 (doi: 10.1038/nprot.2009.203)
- 4 Orth J.D., Thiele I., & Palsson B. O. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 2010, 28(3), 245-248 (doi: 10.1038/nbt.1614)
- 5 Kim O.D., Rocha M., & Maia P. A review of dynamic modeling approaches and their application in computational strain optimization for metabolic engineering. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9, 1690 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01690)
- 6 Reed J.L. Shrinking the metabolic solution space using experimental datasets, 2012 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1002662)
- 7 Gudmundsson S., & Thiele, I. Computationally efficient flux variability analysis. *BMC bioinformatics*, 2010, 11(1): 1-3 (doi: 10.1186/1471-2105-11-489)
- 8 Herrmann H.A., Dyson B.C., Vass L., Johnson G.N., & Schwartz J.M. Flux sampling is a powerful tool to study metabolism under changing environmental conditions. *NPJ systems biology and applications*, 2019, 5(1): 32 (doi: 10.1038/s41540-019-0109-0)
- 9 Rosato D.V. *Plastics engineered product design*. Elsevier, 2013
- 10 Heirendt L., Arreckx S., Pfau T., Mendoza S. N., Richelle A., Heinken A., ... & Fleming, R. M. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. *Nature protocols*, 2019, 14(3): 639-702 (doi: 10.1038/s41596-018-0098-2)
- 11 Ebrahim A., Lerman J.A., Palsson B.O., & Hyduke, D. R. COBRApy: constraints-based reconstruction and analysis for python. *BMC systems biology*, 2013, 7: 1-6 (doi: 10.1186/1752-0509-7-74)
- 12 Carey M.A., Dräger A., Beber M.E., Papin J.A., & Yurkovich, J. T. Community standards to facilitate development and address challenges in metabolic modeling. *Molecular Systems Biology*, 2020, 16(8): e9235 (doi: 10.15252/msb.20199235)
- 13 Folger O., Jerby, L., Frezza C., Gottlieb E., Ruppin E., & Shlomi, T. Predicting selective drug targets in cancer through metabolic networks. *Molecular systems biology*, 2011, 7(1): 501 (doi: 10.1038/msb.2011.35)
- 14 Nilsson A., & Nielsen J. Genome scale metabolic modeling of cancer. *Metabolic engineering*, 2017, 43: 103-112 (doi: 10.1016/j.ymben.2016.10.022)
- 15 Nam H., Campodonico M., Bordbar A., Hyduke D. R., Kim S., Zielinski D. C., & Palsson B. O. A systems approach to predict oncometabolites via context-specific genome-scale metabolic networks. *PLoS computational biology*, 2014, 10(9): e1003837 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1003837)
- 16 Lee S.J., Lee D.Y., Kim T.Y., Kim B.H., Lee J., & Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(12): 7880-7887 (doi: 10.1128/AEM.71.12.7880-7887.2005)
- 17 Alper H., Miyaoku K., & Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nature biotechnology*, 2005, 23(5): 612-616 (doi: 10.1038/nbt1083)
- 18 Zhang B., Zhang X. M., Wang W., Liu Z.Q., & Zheng Y.G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for d-pantothenic acid production. *Food chemistry*, 2019, 294, 267-275 (doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.044)

- 19 Alper H., Jin Y.S., Moxley J.F., & Stephanopoulos, G. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 2005, 7(3): 155-164 (doi: 10.1016/j.ymben.2004.12.003)
- 20 Fong S.S., Burgard A.P., Herring C.D., Knight E.M., Blattner F.R., Maranas C D., & Palsson B.O. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 2005, 91(5): 643-648 (doi: 10.1002/bit.20542)
- 21 Wang Q., Chen X., Yang Y., & Zhao X. Genome-scale in silico aided metabolic analysis and flux comparisons of *Escherichia coli* to improve succinate production. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73, 887-894 (doi: 10.1007/s00253-006-0535-y)
- 22 Nguyen L.T., & Lee E.Y. Biological conversion of methane to putrescine using genome-scale model-guided metabolic engineering of a methanotrophic bacterium *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Biotechnology for biofuels*, 2019, 12, 1-12 (doi: 10.1186/s13068-019-1490-z)
- 23 Nguyen A.D., Hwang I.Y., Lee O.K., Kim D., Kalyuzhnaya M.G., Mariyana R., ... & Lee E.Y. Systematic metabolic engineering of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z for 2, 3-butanediol production from methane. *Metabolic engineering*, 2018, 47, 323-333 (doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.010)
- 24 Schulz C., Kumelj T., Karlsen E., & Almaas E. Genome-scale metabolic modelling when changes in environmental conditions affect biomass composition. *PLoS Computational Biology*, 2021, 17(5), e1008528 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1008528)
- 25 Oberhardt M.A., Zarecki R., Reshef L., Xia F., Duran-Frigola M., Schreiber R., ... & Ruppin, E. Systems-wide prediction of enzyme promiscuity reveals a new underground alternative route for pyridoxal 5'-phosphate production in *E. coli*. *PLoS computational biology*, 2016, 12(1): e1004705 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1004705)
- 26 Prigent S., Nielsen, J. C., Frisvad, J. C., & Nielsen, J. Reconstruction of 24 *Penicillium* genome-scale metabolic models shows diversity based on their secondary metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(10): 2604-2612 (doi: 10.1002/bit.26739)
- 27 Seif Y., Kavvas E., Lachance J.C., Yurkovich J.T., Nuccio S.P., Fang X., ... & Monk J.M. Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Salmonella* strains reveal serovar-specific metabolic traits. *Nature communications*, 2018, 9(1): 3771 (doi: 10.1038/s41467-018-06112-5)
- 28 Peñalver Bernabé B., Thiele I., Galdones E., Siletz A., Chandrasekaran S., Woodruff T.K., ... & Shea L.D. Dynamic genome-scale cell-specific metabolic models reveal novel inter-cellular and intra-cellular metabolic communications during ovarian follicle development. *BMC bioinformatics*, 2019, 20(1): 1-16 (doi: 10.1186/s12859-019-2825-2)
- 29 Shoaie S., Ghaffari P., Kovatcheva-Datchary P., Mardinoglu A., Sen P., Pujos-Guillot E., ... & Nielsen J. Quantifying diet-induced metabolic changes of the human gut microbiome. *Cell metabolism*, 2015, 22(2): 320-331 (doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.001)
- 30 King Z.A., Lu J., Dräger A., Miller P., Federowicz S., Lerman J.A., ... & Lewis N.E. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic acids research*, 2016, 44(D1): D515-D522 (doi: 10.1093/nar/gkv1049)
- 31 Karp P.D., Midford P.E., Billington R., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., ... & Paley S. M. Pathway Tools version 23.0 update: software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in bioinformatics*, 2021, 22(1): 109-126 (doi: 10.1093/bib/bbz104)
- 32 Lieven C., Beber M.E., Olivier B.G., Bergmann F.T., Ataman M., Babaei P., ... & Zhang C. MEMOTE for standardized genome-scale metabolic model testing. *Nature biotechnology*, 2020, 38(3): 272-276 (doi: 10.1038/s41587-020-0446-y)
- 33 Gilbert J., Percy N., Norman R., Millat T., Winzer K., King J., ... & Twycross J. (2019). Gsmotutils: a python based framework for test-driven genome scale metabolic model development. *Bioinformatics*, 35(18): 3397-3403 (doi: 10.1093/bioinformatics/btz088)
- 34 Lachance J.C., Lloyd C.J., Monk J. M., Yang L., Sastry A.V., Seif Y., ... & Jacques P.É. BOFdat: Generating biomass objective functions for genome-scale metabolic models from experimental data. *PLoS computational biology*, 2019, 15(4): e1006971 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1006971)

А.М. ИСИМОВ*, Г.Б. АДМАНОВА, Н.К. КЕМАЛОВА, А.Т. САРЖИГТОВА,
Б. БАҚЫТЖАНҚЫЗЫ
Қ. Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік университеті, Ақтөбе, Қазақстан
*e-mail: knk17@bk.ru

PYTHON ГЕНОМДЫҚ МАСШТАБТАҒЫ МЕТАБОЛИКАЛЫҚ МОДЕЛЬДІ ҚАЙТА ҚҰРУ ЖӘНЕ ТАЛДАУ ҚҰРАЛЫ РЕТІНДЕ

Түйін

Өткізу қабілеті жоғары технологиялардың шығындарының төмендеуі omics деректер жиынтығының қол жетімділігінің артуын ескеретін деректерді талдау әдістерін жасауға әкелді. Бұл әдістің мысалы-шектеулерге негізделген геномдық масштабтағы метаболикалық модельдеу. Ол метаболикалық ағындардың стационарлық таралуын сипаттау үшін, omics деректерін біріктіру үшін қолданылатын биохимиялық желілерді пайдаланатын құрылым. Осылайша, сызықтық бағдарламалау арқылы шешуге болатын масса балансының теңдеулер жүйесі құрылады. Бүгінгі таңда геномды шектеуге негізделген модельдеу бағдарламалық жасақтамасының көпшілігі танымал меншікті бағдарламалау тілі MATLAB-қа негізделген. Алайда, Matlab omics деректер жиынтығын біріктіру және метаболизмнен тыс күрделі биологиялық процестерді модельдеу кезінде қиындықтарға тап болады. Керісінше, Python, объектіге бағытталған ашық бастапқы бағдарламалау тілі - бұл мәселелерді шешудің ең жақсы таңдауы. Ол салыстырмалы түрде қарапайым синтаксиске ие, кең қауымдастықты ұсынады және omics деректер жиынтығының үздіксіз интеграциясын қамтамасыз етеді. Осы факторлардың арқасында Python шектеулерге негізделген геномдық масштабтағы метаболиттік модельдеудің жақсы құралы болып табылады. Бұл шолудың мақсаты-шектеулерге негізделген геномдық масштабтағы метаболикалық модельдеуге арналған Python негізіндегі құралдарға кіріспе және жүйелі шолуды ұсыну. Біз бағдарламаны орнаттық, тексердік және шолуда сипатталған әрбір құралды қолдануға тырыстық. Біз әр құралды үш санаттың біріне топтастырдық (геномдық метаболиттік модельдеу және техникалық қызмет көрсету, фенотипті модельдеу немесе бейнелеу бағдарламалық жасақтамасы) және қажет болған жағдайда құрал мен тұжырымдамаға егжей-тегжейлі түсініктеме бердік.

Кілтті сөздер: шектеулерге негізделген модельдеу, геномдық масштабтағы метаболикалық модель, Python, ағын балансын талдау, силикодағы модельдеу.

МРНТИ: 68.41

А.М. ИСИМОВ*, Г.Б. АДМАНОВА, А.Т. САРЖИГТОВА, Н.К. КЕМАЛОВА,
Б. БАҚЫТЖАНҚЫЗЫ
Актюбинский региональный университет имени К.Жубанова, Актөбе, Казахстан
*e-mail: knk17@bk.ru

PYTHON КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ И АНАЛИЗА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ В МАСШТАБЕ ГЕНОМА

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.03

Аннотация

Снижение затрат на технологии с высокой пропускной способностью привело к разработке методов анализа данных, которые учитывают растущую доступность наборов данных omics. Примером такого метода является метаболитическое моделирование в масштабе генома, основанное на ограничениях. Он использует данные omics и биохимические сети, а механистическая структура для объединения данных omics для описания стационарных распределений метаболитических потоков. Таким образом, создается система уравнений баланса массы, которая может быть решена с помощью линейного программирования. На сегодняшний день большинство программных средств для моделирования генома на основе ограничений опирается на MATLAB, популярный проприетарный язык программирования. Однако у Matlab возникают проблемы при интеграции

наборов данных omics и моделировании сложных биологических процессов, выходящих за рамки метаболизма. Напротив, Python, объектно-ориентированный язык программирования с открытым исходным кодом, является лучшим выбором для решения этих проблем. Он имеет относительно простой синтаксис, предлагает обширное сообщество и обеспечивает бесшовную интеграцию наборов данных omics. Благодаря этим факторам, Python является хорошим появляющимся инструментом для моделирования метаболизма в масштабе генома на основе ограничений. Цель этого обзора - представить введение и систематический обзор инструментов на базе Python для метаболического моделирования в масштабе генома на основе ограничений. Мы установили, проверили документацию и попробовали использовать каждый инструмент, описанный в обзоре. Мы сгруппировали каждый инструмент в одну из трех категорий (геномная метаболическая реконструкция и поддержание, моделирование фенотипа или программное обеспечение для визуализации) и при необходимости предоставили подробные пояснения к инструменту и концепции.

Ключевые слова: моделирование на основе ограничений, метаболическая модель в масштабе генома, Python, анализ баланса потоков, моделирование *in silico*.

Появление и последующее снижение стоимости технологий omics с высокой пропускной способностью привело к разработке различных методов анализа данных [1]. Применение этих методов позволило охарактеризовать клетки не как отдельные объекты, а как систему взаимодействующих биологических компонентов. Метаболическое моделирование в масштабе генома, основанное на ограничениях, использует данные omics (в первую очередь последовательности генома) и биохимические сети, механистическую структуру, для объединения данных omics и ответа на соответствующие биологические вопросы о метаболических взаимосвязях генотип-фенотип [2]. Биохимическую сеть можно рассматривать как проточную сеть, в которой метаболиты протекают внутри сети таким же образом, как жидкости проходят по трубе. После этого эти биохимические сети преобразуются в математический формат (называемый стехиометрической матрицей) для вычислительных целей (рисунок 1).

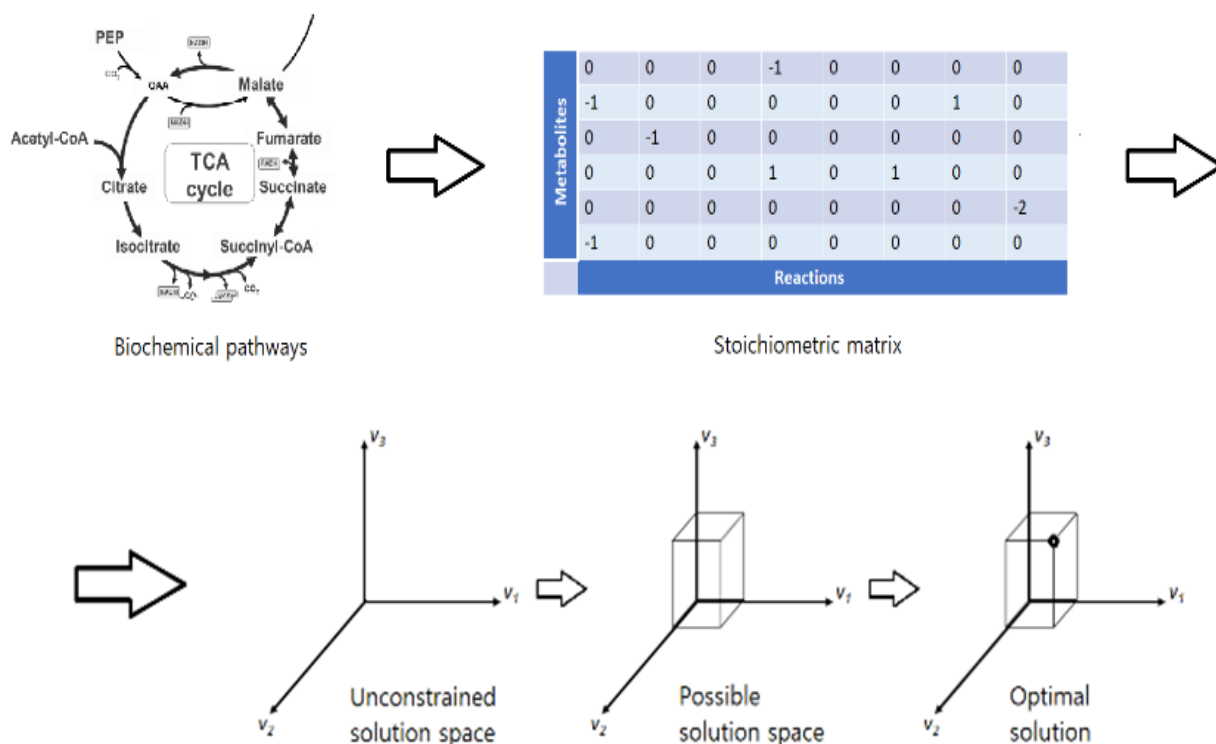


Рисунок 1 - От биохимических путей к оптимальному решению

Стехиометрическая матрица представляет собой структурированную и систематизированную базу знаний о биохимических превращениях внутри конкретного организма-мишени. Он используется для вычисления стационарных распределений потоков, которые удовлетворяют целевой функции, определяемой пользователем реакции с использованием линейной оптимизации. В стехиометрической матрице S размера $m \times n$ каждая строка матрицы принадлежит одному уникальному метаболиту (в общей сложности m метаболитов), а каждый столбец принадлежит отдельной реакции (в общей сложности n реакций) [3]. Каждая запись в колонке представляет собой стехиометрический коэффициент метаболитов реакции. Произведенные метаболиты имеют положительные коэффициенты, в то время как потребленные метаболиты имеют отрицательные коэффициенты. Для каждого метаболита, который не участвует в реакции, используется нулевой стехиометрический коэффициент. Таким образом, S представляет собой разреженную матрицу, поскольку в реакциях обычно участвует несколько метаболитов. Поток (flux), который проходит через все реакции, показан в виде вектора v длины n . Концентрации метаболитов представлены в виде вектора x длины n . Система уравнений баланса массы в установившемся режиме ($dx/dt = 0$) представлена ниже:

$$Sv = 0$$

Нулевое пространство S - это любое значение v , которое решает уравнение. Для любой реалистичной стехиометрической матрицы количество неизвестных переменных (реакций) больше, чем количество уравнений (метаболитов); таким образом, не существует уникального оптимизационного решения (неограниченное пространство решений). Следовательно, накладываются ограничения для уменьшения максимального числа возможных решений, чтобы поддерживать только фенотипически допустимые состояния внутри пространства возможных решений. Оптимизация целевой функции обычно включает в себя нахождение единственного оптимального решения на границе пространства возможных решений (показано в виде круглой точки) [4].

Основные ограничения связаны с генотипом клетки, окружающей средой и физико-химическими законами [2]. Ограничения клеточного генотипа накладываются путем включения реакций, которые подтверждаются геномными данными. Для реакций, уже включенных в модель, генетические нокауты можно ограничить, установив соответствующие границы реакции равными нулю. Экологические ограничения могут быть наложены путем ограничения скорости поглощения субстратов, ограничивающих рост (таких как источники углерода или электронов). Физико-химические законы включают ограничение равновесия массы в стационарном режиме, указывающее на то, что чистое производство каждого метаболита должно равняться его чистой норме потребления. Кроме того, ферменты могут быть ограничены их производительностью, такой как V_{max} (максимальная скорость реакции). Наконец, обратимость реакции определяется биохимическими характеристиками фермента или сетевыми свойствами (такими как отсутствие образования свободной АТФ).

Несмотря на распространенные заблуждения, метаболическое моделирование в масштабе генома не накладывает ограничений на концентрации белка, мРНК или метаболитов, а подробные кинетические параметры не накладывают ограничений на стандартные модели. Включение дополнительных ограничений либо еще больше ограничивает пространство решений, либо изменяет область применения со статического состояния на кинетическое моделирование, или метаболизм - на другие клеточные процессы (такие как регуляция транскрипции или структурные свойства белка) [2]. Более сложные ограничения включают изменение границ реакции на основе данных об экспрессии генов и белков, концентраций метаболитов и кинетических параметров, либо путем корректировки границ реакции, либо путем отключения реакций [5].

Методы, основанные на ограничениях, основаны на линейном программировании, методе математической оптимизации, для решения уравнения $Sv = 0$. Линейное программирование используется для снижения математической сложности и вычислительных затрат, связанных с биохимическими сетями, которые, как правило, содержат тысячи метаболитов и реакций. Анализ баланса потоков (FBA) является популярным методом, основанным на предположении, что клетки стремятся достичь метаболической цели, обычно максимизации скорости роста [4]. FBA решает уравнение $Sv = 0$, накладывая ограничения на верхнюю и нижнюю границы v и обеспечивая линейную комбинацию потоков в качестве целевой функции, определяемой пользователем реакции. FBA определяет распределение потоков биохимической сети, удовлетворяющее целевой функции. Анализ изменчивости потока (FVA) - это еще один основанный на ограничениях метод, который учитывает максимальное и минимальное значения потока для каждой отдельной реакции внутри сети, когда целевая функция установлена на максимальное значение [6]. Наконец, выборка методом Монте-Карло с цепью Маркова (MCMC) - это метод, который вычисляет множественные распределения потоков для вычисления распределения вероятностей каждого отдельного потока в биохимической сети. В отличие от предыдущих методов, этот метод является беспристрастным, поскольку не требуется никаких предположений об оптимальном росте.

Языки программирования могут быть инструментом для предоставления пользовательских инструкций на основе кода, которые интерпретируются и выполняются центральным процессором [7]. Они использовались для различных задач, включая моделирование рабочих процессов. Набор инструментов реконструкции и анализа на основе ограничений (COBRA), ведущее программное обеспечение для основанных на ограничениях методов метаболического моделирования в масштабе генома, был реализован в MATLAB, популярном проприетарном языке программирования. Однако, благодаря технологическим достижениям в области технологий с высокой пропускной способностью, ограничения MATLAB стали очевидными. В дополнение к запатентованному характеру существуют проблемы, связанные с интеграцией наборов данных omics и моделированием сложных биологических процессов, выходящих за рамки метаболизма. Кроме того, Python, объектно-ориентированный язык программирования с открытым исходным кодом, является лучшим выбором для решения этих проблем [8]. Он имеет относительно простой синтаксис, что снижает порог, необходимый для изучения языка. Кроме того, Python предлагает обширную поддержку сообщества, что частично объясняется его происхождением с открытым исходным кодом. Таким образом, эти факторы сделали Python новым инструментом для моделирования метаболизма в масштабе генома [9].

Метаболические модели в масштабе генома (GEMs) использовались для различных целей, включая открытие лекарств, производство ценных соединений, прогнозирование функции ферментов, панреактомный анализ и многоклеточные взаимодействия.

При разработке лекарств драгоценные камни использовались для изучения метаболических аутокотрофий раковых клеток. Например, GEM был объединен с транскриптомными данными для прогнозирования фенотипов нокаута, чтобы найти мишени для цитостатических препаратов, которые блокируют рост раковых клеток, но не влияют на выработку АТФ и рост "здоровых" клеток [10]. В другом исследовании потенциальные лекарственные мишени для 27 моделей ННС, специфичных для конкретного пациента, были созданы с использованием иммуногистохимических протеомных данных. Лекарственные мишени были выбраны с использованием концепции основного метаболита, идеи о том, что потенциальная летальность при нокауте реакции связана с конкретным метаболитом. Наконец, эффекты предполагаемых мутировавших онкометаболитов (фумаратгидратазы, сукцинатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы) были изучены с использованием распределений потоков, генерируемых MCMC для отбора проб [11].

Драгоценные камни также использовались для изучения различных ценных соединений с использованием стратегий метаболической инженерии. Несколько примеров применения метаболической инженерии включают производство L-валина, ликопина, молочной и янтарной кислот с использованием *Escherichia coli* [12-15]. С увеличением доступности генома число организмов, для которых был реконструирован genome-scale metabolic (GSM), также увеличилось, перейдя от модели к менее изученным организмам. Недавно GSM был применен для метаболической инженерии метанотрофов, бактерий, которые используют метан в качестве основного источника энергии и углерода. В одном исследовании сообщалось, что путресцин был получен путем первой экспрессии генов орнитиндекарбоксилазы линейного пути, а затем с использованием GEM для определения стратегий нокаута генов для улучшения титра путресцина. В другом исследовании аналогичная стратегия была использована для получения 2,3-бутандиола [16].

Драгоценные камни также использовались для прогнозирования различных функций ферментов. Например, GEM позволяет идентифицировать важные гены, которые, как считается, несут ответственность для *Escherichia coli*. Эти предсказания стали возможными благодаря наличию ранее не идентифицированных реакций, которые сделали несущественный ген необходимым для нокаута *in silico*. Среди необязательных генов *gltA*, *argD* и *aspC* были выбраны для дальнейшей экспериментальной проверки, поскольку анализ гомологии последовательностей выявил изоферменты-кандидаты с высокой степенью достоверности. В другом примере неразборчивость ферментов изучалась путем увязки исследований нокаута с GEM [17]. Выбранные гены-мишени были отключены, в то время как гены-заменители - нет. Впоследствии GEM был использован для механистического объяснения распределения потоков ферментов, кодируемых генами-заменителями. Среди пар генов-заменителей мишени предсказанная пара генов *pdxB-thiG* была доказана экспериментально.

Драгоценные камни также использовались для анализа pan-reactome. В одном исследовании иерархическая кластеризация 24 видоспецифичных самоцветов *Penicillium* предоставила информацию о путях биосинтеза вторичных метаболитов, которые дифференцировали различные метаболические клады. В другом исследовании был проведен панреактомный и вспомогательный реактомный анализ 410 штаммов сальмонелл [18]. Моделирование GEM при различном потреблении питательных веществ помогло определить различные возможности и оптимальные условия роста штаммов сальмонеллы.

Наконец, GEMs можно использовать для моделирования взаимодействий между различными клетками, тканями и организмами, включая моделирование микробиома. Например, GEM был использован для моделирования конкурентного поведения между *Geobacter* и *Rhodoferrax*, бактериями, окисляющими ацетат и восстанавливающими Fe(III), которые живут в бескислородной подповерхностной среде [19]. Модель помогла сделать вывод о том, что *Rhodoferrax* был бы доминирующим штаммом при условии наличия достаточного количества аммония в среде. Кроме того, *Geobacter* стал доминирующим штаммом, когда при биоремедиации подземных вод, загрязненных ураном, были добавлены высокие концентрации ацетата *in situ*. В другом примере CASINO, алгоритм, основанный на CSM, был использован для моделирования влияния диеты на микробиом кишечника и его диетические взаимодействия [20]. CASINO смогло предсказать взаимодействие между остью диета-микробиота-хозяин у 45 пациентов с избыточным весом и ожирением. Кроме того, были изучены метаболические способности микробов в просветах полости рта пациентов с избыточной массой тела и ожирением. Исследование показало значительное изменение содержания короткоцепочечных жирных кислот и аминокислот после изменения привычек питания.

Цель этого обзора - представить введение и систематический обзор инструментов на базе *Python*, используемых для метаболического моделирования в масштабе генома на основе ограничений. Мы установили, проверили документацию и попробовали использовать каждый инструмент, описанный в обзоре. Основываясь на основных

функциях, мы разделили каждый инструмент на три категории: реконструкция и обслуживание драгоценных камней, моделирование фенотипа или программное обеспечение для визуализации.

Процесс реконструкции GEM состоит из четырех основных этапов: создание проекта реконструкции, преобразование в математическую модель, сбор биологической информации об интересующем организме и уточнение модели на основе информации, относящейся к конкретному организму. Первые два этапа основаны на подходе "сверху вниз", когда аннотированные гены интересующего организма используются для назначения и включения соответствующих ферментативных реакций в математическую модель. Эти шаги могут быть автоматизированы аналогично конвейерам аннотаций генома. Следующие два этапа требуют обширного обзора литературы и специальных знаний об интересующем организме и выполняются вручную. Таким образом, качество реконструкции зависит от качества и количества информации, специфичной для конкретного организма [21].

Реконструированный GEM должен включать информацию о стехиометрии и направленности каждой реакции, формулах метаболитов, использовании субстрата и кофактора, а также внутриклеточном pH. Кроме того, GEM должен включать спонтанные реакции и реакции переноса, позволяющие прогнозировать скорость роста *in silico*, состав биомассы и ее фракционный вклад в общую биомассу клеток, а также поддержание АТФ, связанное с ростом (GAM). Если в биохимической сети отсутствуют реакции, выполняется заполнение пробелов - метод линейного программирования со смешанным целым числом для определения наименьшего числа реакций, чтобы заполнить пробелы и получить готовый к моделированию GEM. Этап уточнения модели был выполнен для проверки проекта математической модели путем количественного сравнения прогнозируемых скоростей роста *in silico* с экспериментальными данными в химически определенной среде выращивания. Дополнительную информацию о процессе реконструкции GEM можно найти в опубликованном протоколе [3]. Хорошее программное обеспечение для реконструкции GEM должно позволять быстро генерировать проект метаболической модели, легко интегрировать данные, относящиеся к конкретному организму, и организованно отслеживать изменения во время уточнения модели (таблица 1).

CarveMe - это инструмент, который позволяет автоматически создавать эскизы и готовые к моделированию драгоценные камни из базы данных эталонных моделей. CarveMe использует модели BiGG в качестве исходной базы данных для метаболических реакций [22]. CarveMe работает за счет уменьшения количества реакций в исходной эталонной модели; следовательно, в модели остаются только реакции с некоторыми признаками присутствия (например, аннотацией генома). Впоследствии было выполнено автоматическое заполнение зазоров для получения готового к моделированию черного камня. CarveMe позволяет реконструировать прокариотический GEMM только с функцией выбора грамположительной или грамотрицательной матрицы.

PythonCyc - это интерфейс прикладной программы на Python к Pathway Tools, популярному программному пакету биоинформатики для pathway и геномной информатики и системной биологии [23]. Область применения инструментов Pathway выходит за рамки моделирования на основе ограничений; однако к его компоненту моделирования в масштабе генома можно получить доступ через MetaFlux. MetaFlux использует базы данных Pathway/Genome Database (PGDB) и MetaCyc и последующее автоматическое заполнение пробелов для создания готовых к моделированию проектов GEMs.

Gsmotutils - это еще одна методология, предложенная для непрерывного управления моделями в масштабе генома, особенно для синтетической биотехнологии и применения в промышленных системах [24]. Авторы Gsmotutils утверждают, что основным отличием между Gsmotutils и Memote является уменьшенная избыточность в модельных версиях Gsmotutils, которая достигается с помощью design deltas, набора изменений, необходимых для преобразования штамма дикого типа в промышленно значимый штамм.

Таблица 1- Подробное описание инструментов для реконструкции драгоценных камней

Имя	Функция	Ввод	Выходной сигнал	Репозиторий или эквивалент	Документ. или эквивалент	Сптд. Python Ver.
Carve Me	Реконструкция специфичной для организма модели	Файл FASTA или идентификатор NCBI	Проект модели в формате XML	https://github.com/cdanielmachado/carveme	https://carveme.readthedocs.io	2.7 и 3.6
Python Cys	Реконструкция модели	Никаких конкретных входных данных не требуется, но организм должен быть доступен в базе данных Pathway Tools	Проект модели в формате XML	https://github.com/eco-cyc/PythonCys	https://pythoncyc.readthedocs.io	2.7 и 3.5+
Gsmo dutils	Непрерывная интеграция данных на основе тестирования для промышленных систем и приложений синтетической биологии	Проект модели в формате XML	Обновленная модель в формате XML	https://github.com/SBRoutingham/gsmo dutils	https://gsmo dutils.readthedocs.io	2.7+ и 3.6+
Примечание: Ячейки со знаком дефиса в таблице указывают на то, что либо не было доступной информации для заполнения ячейки, либо в инструменте отсутствует функция, которая должна быть заполнена в ячейке. Python 2.x относится к Python 2, Python 3.x относится к Python 3, + относится к выпускам версий Python над номером, рядом с которым расположен знак +						

Cobra toolbox - это набор методов моделирования на основе ограничений для манипулирования драгоценными камнями. Это популярный пакет для манипулирования драгоценными камнями, который, как сообщается, используется 60% исследовательского сообщества COBRA [2]. COBRAPy - это Python - реализация Cobra toolbox на языке. Кобрапия позволяет реконструировать модель, в силико моделирование и аналитические методы. В силико моделирование было основано на анализе баланса потоков. В дополнение к обычному FBA, COBRAPy имеет экономный FBA (pFBA), анализ изменчивости потока (FVA) и looless FBA. pFBA минимизирует общий поток внутри биохимической сети, удовлетворяя модельным ограничениям и решая поставленную задачу функция [4]. Основное предположение заключается в том, что под давлением роста существует процедура отбора штаммов, которые могут перерабатывать субстрат для роста наиболее быстрым и эффективным способом при использовании минимального количества фермента. FVA - это вычислительный инструмент, который позволяет вычислять нижнюю и верхнюю границы отдельных реакционных потоков внутри биохимической сети. Это позволяет нам оценить, существует ли альтернативное оптимальное решение для каждой интересующей реакции. Бескольцевой FBA устраняет термодинамически неосуществимые циклы, набор реакций, которые приводят к нереально высоким значениям потока и в силико темпы роста. Аналитический методы включают производственные оболочки, отбор проб потока и манипулирование средой. Производственные оболочки, или фенотипические фазовые плоскости, рассчитывают компромисс между потоком в силико скорость роста и желаемый продукт, что представляется полезным при разработке стратегий

метаболической инженерии. Отбор проб потока позволяет нам получить средние значения потока для отдельных реакций в биохимической сети. Это может позволить сравнить значения потока отдельных реакций при различных условиях окружающей среды [8].

PSAMM - это еще один набор методов моделирования на основе ограничений для манипулирования драгоценными камнями. PSAMM предлагает ту же функциональность, что и COBRApy. Кроме того, он расширяет функциональность COBRApy, предлагая контроль версий, который представляет собой автоматическое сравнение версий модели во время реконструкции модели. Контроль версий выполняется путем проверки параметров модели, таких как стехиометрия реакции, согласованность формулы, согласованность заряда, проверка согласованности потока и *garcheck*, а также идентификация метаболитов, которые не могут переносить какой-либо поток внутри метаболической сети. Официальная документация PSAMM представляется более удобной для пользователя, чем документация COBRApy, с руководствами, описывающими устранение распространенных проблем. PSAMM экспортирует модели, которые можно конвертировать с помощью COBRApy, что позволяет интегрировать эти два программного обеспечения [25].

PyFBA - это аналогичный набор методов, основанных на ограничениях, для манипулирования драгоценными камнями. PyFBA имеет только базовые функции, такие как манипулирование моделью, базовый анализ FBA и заполнение пробелов. Документация представляется неполной, так как некоторые ссылки не могли быть открыты при написании этого обзора. Кроме того, необходима предварительная установка базы данных исходных данных модели.

Sameo - это библиотека Python, которая призвана помочь в рациональном проектировании штаммов для целей метаболической инженерии. Sameo - это модульная структура, состоящая из четырех основных модулей:

- 1) Моделирование и анализ модели на основе FBA;
- 2) Прогнозирование стратегий нокаута генов с использованием эволюционных алгоритмов OptGene или линейных алгоритмов OptKnock.
- 3) Предсказание мишеней модуляции экспрессии, реакций или генов, которые могут быть понижены или чрезмерно отрегулированы для достижения биологической цели, такой как выведение интересующего продукта;
- 4) Прогнозирование кратчайших возможных гетерологичных метаболических путей, которые должны быть введены. Поиск гетерологичных реакций осуществляется с использованием универсальной модели базы данных реакций, которая объединяет реакции из разных источников (БРЕНДА, БИГГ, РЕЯ, КЕГГ) [26-28].

Sameo имеет подробную документацию, которая может быть использована как опытными, так и неопытными программистами. Разработчики могут использовать Sameo для настройки рабочих процессов анализа или разработки новых алгоритмов. Неопытные программисты могут сослаться на деформационный дизайн с использованием высокоуровневого интерфейса [20]. Sameo был построен на COBRApy и совместим с ним.

Существует также несколько специальных инструментов моделирования, которые используют один или несколько методов, основанных на ограничениях. Эти инструменты могут быть использованы, если общие инструменты не могут быть использованы, или дополнительно, если необходим более детальный анализ. В целом, конкретные инструменты проще, а их документация легче для понимания.

GAPSLIT - это реализация Python для случайной выборки моделей, основанных на ограничениях. GAPSLIT нацелен на области с недостаточной выборкой в пространстве решений flux, что приводит к более равномерному охвату моделей выборкой. GAPSLIT можно использовать для сравнения драгоценных камней в различных условиях окружающей среды (например, при выращивании на разных источниках углерода), чтобы получить средние значения потока для отдельных реакций.

FastSL-py - это алгоритм для идентификации синтетических леталов высшего порядка в драгоценных камнях. Более высокие синтетические летальные исходы - это наборы генов или реакций, которые могут подавлять скорость роста организма только тогда, когда все они инактивированы. Это может позволить идентифицировать неожиданные генетические изменения и комбинаторные лекарственные мишени.

CoVAMP - это модульный фреймворк для сетевого анализа драгоценных камней. CoVAMP реализует два типа сетевого анализа: режимы элементарного потока (EFMs) и наборы минимальных сокращений (MCSSs). ЭФМ минимальны, не поддаются разложению и имеют стационарные пути внутри метаболической сети. EFM может быть использован в метаболической инженерии для определения кратчайших биохимических путей, которые генерируют интересные продукты. MCSS - это концепции, связанные с EFMs [29].

Таблица 2- Подробное описание инструментов статического моделирования

Имя	Функция	Ввод	Выходной сигнал	Репозиторий или эквивалент	Документ. или эквивалент	Сптд .Python Ver.
1	2	3	4	5	6	7
Cobra toolbox	Реконструкция модели, манипулирование и анализ	Новые модели могут быть созданы с нуля, поддерживаются модели в форматах XML, JSON, YAML, MATLAB и Pickle	В зависимости от цели исследователя возможно несколько результатов	https://github.com/ocobra/cobra-py	https://cobrapy.readthedocs.io	3.x
PSAMM	Реконструкция, обслуживание и анализ модели	Поддерживает модели в форматах YAML (предпочтительный формат), XML, JSON и Excel	В зависимости от цели исследователя возможно несколько результатов	https://github.com/hanglab/psamm , https://github.com/hanglab/psamm-import	https://psamm.readthedocs.io	2.7 и 3.x
PyFBA	Реконструкция модели, заполнение пробелов и анализ баланса потоков	Модель в формате SMBL	В зависимости от цели исследователя возможно несколько результатов	http://linsalrob.github.io/PyFBA/	http://linsalrob.github.io/PyFBA	2.7 и выше
Cameo	Рабочие процессы метаболической инженерии для рационального проектирования деформаций	Поддерживает модели в форматах XML, JSON, Pickle, возможна загрузка моделей из базы данных BiGG Models	В зависимости от цели исследователя возможно несколько результатов	https://github.com/biosustain/cameo	https://cameo.bio	3.x

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7
GAPS LIT	Случайная выборка	Модель в формате XML, количество образцов для генерации	Список случайно отобранных отдельных потоков	https://github.com/jen-senlab/gapsplit	-	3.x
FastSL	Эффективная идентификация синтетических смертельных генов и/или наборов реакций	Модель в формате MAT	Список каталогов генов в формате CSV	https://github.com/RamanLab/FastSL-py	https://fastsl-py.readthedocs.io	3.5 и 3.6
CoBAMP	Концепции анализа траекторий, такие как элементарные режимы потока и минимальные наборы отрезков	Модель в формате XML	Коэффициенты потока в виде словарей Python	https://github.com/BioSystemsUM/cobamp	https://cobamp.readthedocs.io	3.x
Примечание: Ячейки со знаком дефиса в таблице указывают на то, что либо не было доступной информации для заполнения ячейки, либо в инструменте отсутствует функция, которая должна быть заполнена в ячейке. Python 2.x относится к Python 2, Python 3.x относится к Python 3, + относится к выпускам версий Python над номером, рядом с которым расположен знак +						

Зависящие от контекста драгоценные камни можно рассматривать как следующий уровень ограничений, применяемых к драгоценным камням, в дополнение к обычным ограничениям. Эти дополнительные ограничения обычно связаны с интеграцией многомерных данных, таких как транскриптом-, данные, основанные на протеомах, метаболомах или флюксомах. Было показано, что контекстно-зависимые геммы описывают лучшее распределение потоков в клетках и тканях, а также специфические условия, такие как различные стадии развития клеток [30].

Ssbio - это конвейер для создания моделей геномного масштаба с белковыми структурами (GEM-PROs). GEM-PROs - это расширение обычных GEMs, которые добавляют данные, связанные с белками, в GEMs, преобразуя их в базы знаний, связанные с белками. Аннотация выполняется путем сопоставления идентификаторов белков из модели с биохимическими базами данных, такими как KEGG или UniProt. Данные, связанные с белком, должны включать архитектуру домена, семейство белковых складок, стехиометрию или структурную информацию. Моделирование гомологии возможно для белков, у которых отсутствует доступная структура. GEM-PROs можно использовать в различных приложениях, в зависимости от интересов исследователя. Одним из примеров является исследование того, как изменения в структуре белка могут влиять на клеточный метаболизм. Ssbio располагает подробной документацией с пошаговыми руководствами как по реконструкции GEM-PRO, так и по использованию GEM-PRO, которые уже были реконструированы. Поскольку для реконструкции GEM-PRO на сегодняшний день требуется сбор обширных данных о белках, только GEM-PRO для *Escherichia coli* был реконструирован.

Metabolites2Network - это простой код на Python, который помогает интерпретировать метаболические профили, связывая метаболиты с их соответствующими метаболическими реакциями с GEMs [31]. Metabolites2Network использует метод, основанный на ChEBI-онтологии, для отображения метаболитов, который позволяет отображать, несмотря на

различия в информации идентификатора и аннотации между базой данных и GEMs. Этот инструмент был использован для привязки липидомных наборов данных к Recon2.2, высококачественному человеческому драгоценному камню.

RIPTiDE - это простой инструмент, который создает контекстно-зависимые бактериальные жемчужины для изучения адаптивной эволюции, движущей силы микробных взаимодействий и проявления болезни. Чтобы достичь этого, RIPTiDE интегрирует рFBA с транскриптомными данными [4]. Инструмент соотносит средние значения потока с имеющимися данными и минимизирует поток за счет реакций с низким содержанием транскриптов. Это позволяет идентифицировать энергоэффективные биохимические пути, которые активны в клетках. Риптид был использован для идентификации активных контекстно-зависимых путей в *Escherichia coli* ул. К-12, без предварительного знания состава среды. Кроме того, инструмент правильно предсказал темпы роста *Escherichia coli* str. К-12, полученный из обработанной клиндамицином слепой кишки мыши.

pyTFA - это Python-реализация анализа потоков на основе термодинамики. Он объединяет количественные данные метаболомики, такие как концентрации метаболитов и свободные энергии Гиббса, для термодинамического ограничения направленности реакции в драгоценных камнях. Затем эти термодинамические ограничения объединяются с FBA в одну и ту же математическую задачу. Модели pyTFA были построены на моделях COBRApy с тремя дополнительными слоями. Первый слой содержит информацию о концентрации каждого метаболита в компартменте, ионной силе, pH и других свойствах. Второй слой содержит метаболиты с идентификатором SeedID для получения термодинамических значений из баз данных. Третий слой содержал аннотационную информацию о каждом метаболите. Инструмент использовался для ограничения как сокращенного, так и полного *Escherichia coli* GEM (iJO1366). *pyTFA* имеет хорошо написанную документацию с простым примером сценария.

Таблица 3- Подробное описание инструментов генерации контекстно-зависимых моделей

Имя	Функция	Ввод	Выходной сигнал	Репозиторий или эквивалент	Документ. ил и эквивалент	Сптд. Python Ver.
1	2	3	4	5	6	7
Ssbio	База знаний, которая связывает модели со структурными данными, связанными с белками	Идентификаторы генов / белков, последовательность и белков, если необходимо, моделируйте в формате XML или MAT	Модель GEM-PRO в формате XML	https://github.com/SBRG/ssbio	https://ssbio.readthedocs.io ; https://github.com/SBRG/GEMPro	3.x
Metabolite s2Network	Сопоставление липидов из наборов данных липидомики с метаболитами в метаболических сетях на основе онтологии ChEBI	Метаболомный набор данных о метаболитах, присутствующих в интересующей модели, в формате JSON или TSV (приведен пример создания набора данных)	Список подобранных метаболитов в формате TSV или JSON	https://forge.mia.inra.fr/metexplore/metabolomics2network	-	3.4

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
RIPTi DE	Минимизация потока на основе интеграции данных транскриптомик и для бактериальных моделей	Модель в формате XML; данные транскриптома в формате TSV	Модифицированная модель в формате XML с уменьшенным пространством решения, которое должно обеспечить более точное распределение потока	https://github.com/mjenior/riptide	https://github.com/mjenior/riptide	3.6+
pyTF A	Интеграция количественных данных метабономики	Модель в формате XML	Термодинамически ограниченная модель в формате XML	https://github.com/EPFL-LCSB/pytfa	https://pytfa.readthedocs.io	3.5
Примечание: Ячейки со знаком дефиса в таблице указывают на то, что либо не было доступной информации для заполнения ячейки, либо в инструменте отсутствует функция, которая должна быть заполнена в ячейке. Python 2.x относится к Python 2, Python 3.x относится к Python 3, + обратитесь к выпускам версий Python над номером, рядом с которым расположен знак +						

Создание модели с учетом затрат на фермент в зависимости от контекста

Прогнозирующая способность *GEM* основана на относительно приблизительном описании состава биомассы, которое учитывает только зависящие от роста изменения, происходящие в клеточном метаболизме. Энергетические ограничения, налагаемые функциональными макромолекулами на состав биомассы, обычно опускаются. Однако есть некоторые свидетельства того, что, по крайней мере, в масштабе отдельных биохимических путей, ферменты и другие функциональные макромолекулы истощают значительное количество клеточных ресурсов, влияя на паттерны регуляции путей. Таким образом, ожидается, что введение затрат на биосинтез, связанных с ферментами, в уравнение биомассы улучшит результаты в силико предсказания, сгенерированные драгоценными камнями (таблица 4).

Существуют два концептуально схожих, но независимых подхода, которые решают эту проблему: анализ баланса ресурсов (RBA) и метаболизм и макромолекулярная экспрессия (ME) [32]. Принцип, лежащий в основе этих подходов, заключается в том, что ферменты и другие функциональные макромолекулы добавляются в качестве псевдометаболитов к составу биомассы, а максимальная емкость фермента, которая является продуктом количества фермента и числа его оборотов, также добавляется в качестве дополнительного ограничения на распределение метаболического потока.

RBApy - это Python - реализация фреймворка RBA. Реконструкция модели RBA сложна; однако RBApy предоставляет подробную документацию. Чтобы начать реконструкцию модели, необходимо ввести идентификатор таксона Uniprot organism для создания вспомогательных файлов. Внутри этих вспомогательных файлов должна быть указана следующая информация: отделения для метаболитов, потребляемые или произведенные метаболические предшественники биомассы и информация о молекулярном механизме, такая как тРНК, средний состав шаперонов и состав рибосом. Кроме того, для каждого однозначного белка должна быть предоставлена дополнительная информация о кофакторе (название, структура субъединицы и стехиометрия кофакторов на белок). Дальнейшая калибровка черновой модели выполняется с помощью следующих шагов:

1. Оценка процентного содержания белка на клеточный компартмент, для чего требуются протеомные данные для клеток с разной скоростью роста.

2. Оценка доли неферментативных белков (поддерживающих или хозяйственных белков) на клеточный компартмент, которая может быть оценена по протеомным данным для клеток с различными скоростями роста.

3. Оценка каталитических скоростей ферментов, для чего требуются протеомные и дополнительные флюксомные данные.

Если de novo реконструкция модели невозможна, RBApy позволяет использовать и модифицировать уже реконструированные модели. На сегодняшний день модели RBA уже разработаны для следующих модельных организмов: дикого типа *Bacillus subtilis* 168, дикого типа *Escherichia coli* K-12, и спроектированная фиксация CO₂ *Escherichia coli* K-12 напряжение. Наконец, RBApy имеет встроенную интеграцию с популярными программами визуализации, такими как *Escher* и *Proteomaps*.

COBRAME - это расширение COBRAPy, целью которого является построение моделей ME с уменьшенным размером и сложностью [33]. ME-модели предсказывают оптимальную макромолекулярную экспрессию, количество отдельных белков, нуклеотидов и кофакторов, необходимых для оптимального роста. Чтобы достичь этого, COBRAME соединяет отдельные реакционные потоки с синтезом родственных макромолекул. Синтез макромолекул требует подробной информации о транскрипции, трансляции, зарядке тРНК и реакциях образования белковых комплексов, которые требуют подробной информации (такой как название, стехиометрия, тип РНК, последовательность и связанные субреакции).

Таблица 4- Подробное описание энзимной стоимости включало инструменты генерации контекстно-зависимых моделей

Имя	Функция	Ввод	Выходной сигнал	Репозиторий или эквивалент	Документ. ил и эквивалент	Стпд. Pyth on Ver.
RBApy	Создание и моделирование бактериальных моделей RBA путем интеграции макромолекулярного состава клетки	Аннотированная модель в формате XML, идентификатор организма Uniprot, запрошенный для автоматической загрузки и интеграции данных о макромолекулярном составе в модель	Ограниченная модель RBA в формате XML	https://sysbio.inra.github.io/RBApy	https://sysbio.inra.github.io/RBApy/usage.html	2.x и 3.x
COBRAME	Программная основа для генерации ME-моделей путем интеграции затрат на биосинтез протеома	Никаких конкретных входных данных не требуется, модель ME может быть создана с нуля	Я моделирую в формате JSON или pickle	https://github.com/SBRG/cobrame	https://cobrame.readthedocs.io	2.7+ и 3.5+

Примечание: Ячейки со знаком дефиса в таблице указывают на то, что либо не было доступной информации для заполнения ячейки, либо в инструменте отсутствует функция, которая должна быть заполнена в ячейке. Python 2.x относится к Python 2, Python 3.x относится к Python 3, + относится к выпускам версий Python над номером, рядом с которым расположен знак +

Хотя метаболическое моделирование в масштабе генома может быть использовано для прогнозирования стационарного метаболизма, оно не может быть использовано для описания роста в условиях изменяющейся внеклеточной среды, такой как периодическое культивирование. Напротив, основы динамического моделирования учитывают переходные состояния, когда концентрации метаболитов изменяются с течением времени, и устойчивые состояния, когда обеспечивается начальная концентрация метаболитов. Динамическое моделирование требует дополнительных ограничений, что делает его сложным в вычислительном отношении. Он основан на параметризованных наборах нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), которые предсказывают временные траектории выбранных процессов и предоставляют выходные данные, которые могут быть интегрированы с экспериментальными данными для нескольких временных точек, когда они доступны. В силико прогнозы основаны на законах кинетической скорости, тогда как конечные значения потока получены с использованием равновесных концентраций метаболитов. В результате ОДУ требуют входных значений для кинетических параметров и экспериментальных концентраций метаболитов. Кинетические параметры могут быть получены из обзора литературы или баз данных. Двумя важными базами данных являются BRENDA и SABIO-RK. BRENDA содержит ручную и автоматически извлеченные данные о специфичных ферментах из первичной научной литературы [16]. SABIO-RK содержит информацию о биохимических реакциях и путях, связанных с ферментами, включая метаболиты, расположение клеток и другую информацию, связанную с ферментами. Информация, связанная с ферментами, которую можно найти в базах данных, включает K_M (Константа Михаэлиса), IC_{50} (половина максимальной ингибирующей концентрации), $k_{\text{кошка}}$ (номер оборота), K_i (константа диссоциации), специфическая активность фермента и $V_{\text{макс}}$ (максимальная скорость реакции). Потенциальным ограничением динамического моделирования является то, что такие подробные модели существуют только для нескольких путей в модельных организмах, таких как *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*, поскольку их кинетические свойства были хорошо охарактеризованы [34].

DMPy - это конвейер для генерации динамической модели FBA без учета затрат на фермент. Он использует биохимическую сеть в качестве входных данных для поиска кинетических скоростей для создания математической модели. Кинетические скорости ищутся в онлайн-базах данных, таких как BRENDA, eQuilibrator и SABIO-RK [16]. Для тарифов, которые несовместимы, неполны или недоступны, используется балансировка параметров. На сегодняшний день были реконструированы следующие модели DMPy: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Lactococcus lactis*.

DynamicME - это расширение COBRAme, которое использует пакетные данные о культуре во времени (fed) для моделирования ME-моделей во времени. Этот инструмент был использован для прогнозирования хода времени *Escherichia coli*. Иерархия использования субстрата iJL1678b на среде со смешанным углеродным субстратом (ацетат, галактоза, глюкоза, глицерин, L-лактат и мальтоза). Это было сделано путем создания ансамбля моделей, которые используют различные субстраты и имеют возмущенные константы скорости. После этого модели были проанализированы путем выявления архетипичных профилей концентрации метаболитов во времени. Кроме того, ограничения на содержание белка, когда текущее содержание белка зависит от количества и роста на предыдущем субстрате ("инерция" белка), изменили метаболические реакции на окружающую среду колебания, такие как пониженное окислительное фосфорилирование и повышенное фосфорилирование на уровне субстрата. Документация DynamicME представляется неполной. В нем есть одно руководство, в котором приведен пример того, как использовать сценарии, описанные в оригинальной публикации. Анализ может быть выполнен путем изменения примеров сценариев, хотя может потребоваться некоторый опыт программирования. Инструмент был реализован на Python 2.7, который в настоящее время устарел.

Таблица 5- Подробное описание инструментов динамического моделирования

Имя	Функция	Ввод	Выходной сигнал	Репозиторий или эквивалент	Документ. или эквивалент	Станд. Python Ver.
DMPy	Конвейер для генерации кинетических метаболических моделей путем поиска скоростей реакций	Модель в формате XML, название организма	Ограниченная модель в формате XML	https://github.com/wurs/sb/DMPy	-	2.7
DynamicME	Динамическая оценка клеточного метаболизма и экспрессии белка	Я моделирую в формате JSON или pickle	Результаты анализа, такие как профили концентрации метаболитов на основе времени в соответствии со сценарием хранилища	https://github.com/SBRG/dynamicme	-	2.7
Примечание: Ячейки со знаком дефиса в таблице указывают на то, что либо не было доступной информации для заполнения ячейки, либо в инструменте отсутствует функция, которая должна быть заполнена в ячейке						

Заключение

Статья содержит введение и систематический обзор инструментов на основе Python для метаболического моделирования в масштабе генома на основе ограничений. Это также иллюстрирует степень, в которой Python может быть использован в таких областях, как реконструкция и обслуживание драгоценных камней, моделирование фенотипа и визуализация. Что касается реконструкции драгоценных камней, некоторые популярные инструменты реконструкции драгоценных камней, такие как ModelSEED или Kbase, недоступны через Python. Тем не менее, разработку программного обеспечения для обслуживания драгоценных камней, такого как Memote и Gsmodutils, можно рассматривать как важную веху, поскольку высококачественная реконструкция драгоценных камней с использованием Python стала возможной с появлением этих инструментов контроля качества. Инструменты моделирования фенотипа на основе Python широко используются для одноклеточных организмов. Однако моделирование драгоценных камней на уровне ансамбля все еще находится на стадии становления. Две области, в которых Python может быть использован в будущем, это - микробиом и болезни человека. Кроме того, может быть изучена интеграция с другими подходами моделирования, помимо кинетического моделирования, такими как транскриптомные сети. Наконец, стоит упомянуть, что если требуемая функциональность недоступна с помощью Python, можно использовать доступные инструменты, написанные на других языках программирования, или автономное программное обеспечение с графическим интерфейсом.

Литература:

- 1Schwarze K., Buchanan J., Fermont J.M., Dreau H., Tilley M.W., Taylor J.M., ... & Wordsworth, S. The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in the United Kingdom. *Genetics in Medicine*, 2020, 22(1), 85-94 (doi: 10.1038/s41436-019-0618-7)
- 2 Bordbar A., Monk J. M., King Z. A., & Palsson, B. O. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(2), 107-120 (doi: 10.1038/nrg3643)
- 3 Thiele I., & Palsson B. Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 2010, 5(1), 93-121 (doi: 10.1038/nprot.2009.203)

- 4 Orth J.D., Thiele I., & Palsson B. O. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 2010, 28(3), 245-248 (doi: 10.1038/nbt.1614)
- 5 Kim O.D., Rocha M., & Maia P. A review of dynamic modeling approaches and their application in computational strain optimization for metabolic engineering. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9, 1690 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01690)
- 6 Reed J.L. Shrinking the metabolic solution space using experimental datasets, 2012 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1002662)
- 7 Gudmundsson S., & Thiele, I. Computationally efficient flux variability analysis. *BMC bioinformatics*, 2010, 11(1): 1-3 (doi: 10.1186/1471-2105-11-489)
- 8 Herrmann H.A., Dyson B.C., Vass L., Johnson G.N., & Schwartz J.M. Flux sampling is a powerful tool to study metabolism under changing environmental conditions. *NPJ systems biology and applications*, 2019, 5(1): 32 (doi: 10.1038/s41540-019-0109-0)
- 9 Rosato D.V. *Plastics engineered product design*. Elsevier, 2013
- 10 Heirendt L., Arreckx S., Pfau T., Mendoza S. N., Richelle A., Heinken A., ... & Fleming, R. M. Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. *Nature protocols*, 2019, 14(3): 639-702 (doi: 10.1038/s41596-018-0098-2)
- 11 Ebrahim A., Lerman J.A., Palsson B.O., & Hyduke, D. R. COBRApy: constraints-based reconstruction and analysis for python. *BMC systems biology*, 2013, 7: 1-6 (doi: 10.1186/1752-0509-7-74)
- 12 Carey M.A., Dräger A., Beber M.E., Papin J.A., & Yurkovich, J. T. Community standards to facilitate development and address challenges in metabolic modeling. *Molecular Systems Biology*, 2020, 16(8): e9235 (doi: 10.15252/msb.20199235)
- 13 Folger O., Jerby, L., Frezza C., Gottlieb E., Ruppin E., & Shlomi, T. Predicting selective drug targets in cancer through metabolic networks. *Molecular systems biology*, 2011, 7(1): 501 (doi: 10.1038/msb.2011.35)
- 14 Nilsson A., & Nielsen J. Genome scale metabolic modeling of cancer. *Metabolic engineering*, 2017, 43: 103-112 (doi: 10.1016/j.ymben.2016.10.022)
- 15 Nam H., Campodonico M., Bordbar A., Hyduke D. R., Kim S., Zielinski D. C., & Palsson B. O. A systems approach to predict oncometabolites via context-specific genome-scale metabolic networks. *PLoS computational biology*, 2014, 10(9): e1003837 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1003837)
- 16 Lee S.J., Lee D.Y., Kim T.Y., Kim B.H., Lee J., & Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(12): 7880-7887 (doi: 10.1128/AEM.71.12.7880-7887.2005)
- 17 Alper H., Miyaoku K., & Stephanopoulos G. Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nature biotechnology*, 2005, 23(5): 612-616 (doi: 10.1038/nbt1083)
- 18 Zhang B., Zhang X. M., Wang W., Liu Z.Q., & Zheng Y.G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for d-pantothenic acid production. *Food chemistry*, 2019, 294, 267-275 (doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.044)
- 19 Alper H., Jin Y.S., Moxley J.F., & Stephanopoulos, G. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 2005, 7(3): 155-164 (doi: 10.1016/j.ymben.2004.12.003)
- 20 Fong S.S., Burgard A.P., Herring C.D., Knight E.M., Blattner F.R., Maranas C D., & Palsson B.O. In silico design and adaptive evolution of *Escherichia coli* for production of lactic acid. *Biotechnology and bioengineering*, 2005, 91(5): 643-648 (doi: 10.1002/bit.20542)
- 21 Wang Q., Chen X., Yang Y., & Zhao X. Genome-scale in silico aided metabolic analysis and flux comparisons of *Escherichia coli* to improve succinate production. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73, 887-894 (doi: 10.1007/s00253-006-0535-y)
- 22 Nguyen L.T., & Lee E.Y. Biological conversion of methane to putrescine using genome-scale model-guided metabolic engineering of a methanotrophic bacterium *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Biotechnology for biofuels*, 2019, 12, 1-12 (doi: 10.1186/s13068-019-1490-z)
- 23 Nguyen A.D., Hwang I.Y., Lee O.K., Kim D., Kalyuzhnaya M.G., Mariyana R., ... & Lee E.Y. Systematic metabolic engineering of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z for 2, 3-butanediol production from methane. *Metabolic engineering*, 2018, 47, 323-333 (doi: 10.1016/j.ymben.2018.04.010)

24 Schulz C., Kumelj T., Karlsen E., & Almaas E. Genome-scale metabolic modelling when changes in environmental conditions affect biomass composition. *PLoS Computational Biology*, 2021, 17(5), e1008528 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1008528)

25 Oberhardt M.A., Zarecki R., Reshef L., Xia F., Duran-Frigola M., Schreiber R., ... & Ruppin, E. Systems-wide prediction of enzyme promiscuity reveals a new underground alternative route for pyridoxal 5'-phosphate production in *E. coli*. *PLoS computational biology*, 2016, 12(1): e1004705 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1004705)

26 Prigent S., Nielsen, J. C., Frisvad, J. C., & Nielsen, J. Reconstruction of 24 *Penicillium* genome-scale metabolic models shows diversity based on their secondary metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(10): 2604-2612 (doi: 10.1002/bit.26739)

27 Seif Y., Kavvas E., Lachance J.C., Yurkovich J.T., Nuccio S.P., Fang X., ... & Monk J.M. Genome-scale metabolic reconstructions of multiple *Salmonella* strains reveal serovar-specific metabolic traits. *Nature communications*, 2018, 9(1): 3771 (doi: 10.1038/s41467-018-06112-5)

28 Peñalver Bernabé B., Thiele I., Galdones E., Siletz A., Chandrasekaran S., Woodruff T.K., ... & Shea L.D. Dynamic genome-scale cell-specific metabolic models reveal novel inter-cellular and intra-cellular metabolic communications during ovarian follicle development. *BMC bioinformatics*, 2019, 20(1): 1-16 (doi: 10.1186/s12859-019-2825-2)

29 Shoaie S., Ghaffari P., Kovatcheva-Datchary P., Mardinoglu A., Sen P., Pujos-Guillot E., ... & Nielsen J. Quantifying diet-induced metabolic changes of the human gut microbiome. *Cell metabolism*, 2015, 22(2): 320-331 (doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.001)

30 King Z.A., Lu J., Dräger A., Miller P., Federowicz S., Lerman J.A., ... & Lewis N.E. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing and sharing genome-scale models. *Nucleic acids research*, 2016, 44(D1): D515-D522 (doi: 10.1093/nar/gkv1049)

31 Karp P.D., Midford P.E., Billington R., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., ... & Paley S. M. Pathway Tools version 23.0 update: software for pathway/genome informatics and systems biology. *Briefings in bioinformatics*, 2021, 22(1): 109-126 (doi: 10.1093/bib/bbz104)

32 Lieven C., Beber M.E., Olivier B.G., Bergmann F.T., Ataman M., Babaei P., ... & Zhang C. MEMOTE for standardized genome-scale metabolic model testing. *Nature biotechnology*, 2020, 38(3): 272-276 (doi: 10.1038/s41587-020-0446-y)

33 Gilbert J., Percy N., Norman R., Millat T., Winzer K., King J., ... & Twycross J. (2019). Gsmotutils: a python based framework for test-driven genome scale metabolic model development. *Bioinformatics*, 35(18): 3397-3403 (doi: 10.1093/bioinformatics/btz088)

34 Lachance J.C., Lloyd C.J., Monk J. M., Yang L., Sastry A.V., Seif Y., ... & Jacques P.É. BOFdat: Generating biomass objective functions for genome-scale metabolic models from experimental data. *PLoS computational biology*, 2019, 15(4): e1006971 (doi: 10.1371/journal.pcbi.1006971)

IRSTI: 34.27.51; 68.39.15

M.G. SAUBENOVA¹, A. RAPOPORT², E.A. OLENIKOVA¹,
S.V. MAKSIMOVICH^{1*}, Zh.N. ERMEKBAY¹

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

²Institute of Microbiology and Biotechnology, Riga, Latvia

*e-mail: seveg@ya.ru

EFFICIENCY OF FEEDER YEAST AND THEIR DERIVATIVES IN ANIMAL HUSBANDRY

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.04

Abstract

For a number of objective reasons, the main ones being the steady growth of the world's population, as well as pronounced changes in climatic conditions that complicate successful agricultural production, the world is facing a significant shortage of food and feed for farm animals, which indicates the need for an urgent increase in their production. The optimal solution to the problem of replenishing the deficiency of food and feed protein, as well as obtaining a number of biologically active substances that have a certain effect on the disease of farm animals and the possibility of counteracting damaging factors of various natures, it seems to be possible to increase the capacity of biotechnological production of microorganism biomass [1, 2]. A generally accepted option for solving these problems is the production of single-cell protein [3-5]. Unicellular biomass contains a higher percentage of protein (30-80%) compared to soy (38.6%), fish (17.8%), meat (21.2%) and whole milk (3.28%), it is a source of essential amino acids, including methionine, threonine and lysine [6]. Microorganisms have attracted attention as a new food source due to their low carbon footprint, low dependence on land, water and seasonal variations, combined with a favorable nutritional profile. Potential microbial protein production technologies, their benefits, the safety and limitations associated with their use, and the prospects for wider large-scale implementation are currently being critically reviewed [7]. This is also relevant because the traditional agricultural way of supplying food animals with proteins is not only insufficient, but can also have negative impact on the environment and therefore should be revised [8].

Keywords: yeast; probiotics; feed additives; postbiotics.

Yeast as probiotics.

Yeasts are recognized as the best microorganisms in the production of unicellular protein, superior to bacteria and algae in the ease of obtaining biomass, high protein content (about 50% of dry biomass) and amino acids, low content of nucleic acids, as well as the ability to grow at different acidity levels. Their physiological characteristics, such as resistance to bile salts and acids and the associated ability to survive in the gastrointestinal environment, hydrophobicity of the cell surface, the ability to autoaggregate, antioxidant activity and β -galactosidase activity made it possible to consider Yeast ORGANISMS as very effective probiotics *in vivo* [9-11].

The latter is of particular interest due to the spread of antibiotic resistance in the vast majority of living eukaryotic organisms and the biological threat to human and animal health, which has led to the need to abandon them as growth promoters and preventive measures in animal husbandry. Since this measure was fraught with a decrease in growth rates and an increase in animal mortality as a result of a number of diseases [12, 13], there was an urgent need to develop an alternative approach to the prevention of infectious diseases and stimulation of animal growth and health.

In this regard, probiotics or direct-fed microbes have been recognized as increasingly popular for improving the health of farm animals and increasing their productivity and have shown great potential for increasing the profitability of livestock farming. Probiotics - microbial cultures, their extracts, enzyme preparations or combinations thereof - when administered in adequate

quantities, improve the health of the host by modulating the intestinal microbial environment, fermentation patterns, nutrient supply and dietary digestibility [14, 15] .

Along with probiotics based on bacterial strains, yeasts, mainly *Saccharomyces* , are widely used *cerevisiae* (SC) [15, 16] , the beneficial effects of which on animals are largely due to the fact that they stimulate the development of rumen microorganisms, and also affect general health and productivity [17, 18] .

From the very beginning of life, the sterile gastrointestinal tract of newborn mammals is colonized by a variety of microorganisms, which is influenced primarily by inoculation from the maternal birth canal [19] . the conditions under which the birth process occurs, diet, as well as prophylactic antimicrobial drugs used in animal husbandry. Numerous studies have established that the most critical period for calves is the period of their transition from a predominantly dairy diet to solid feed, which is carried out in a short period of time. According to some data, mortality from diarrhea during this period reaches 25-87% [20, 21] . Surviving calves show slow growth and a subsequent decrease in productivity [22, 23] , which is associated not only with metabolic adaptation, but also with large changes in the microbiota intestines [24] .

The intestinal microbiota already at an early stage of animal development has an important metabolic significance [25] , it affects energy metabolism [26] and has a major influence on the maturation of the adaptive and innate immune system [19, 27] , which is reflected in performance indicators in later life , as well as resistance to various diseases. A number of studies have discussed the factors that determine the growth of microorganisms colonizing in the rumen, the formation of commensal microbiota after weaning, as well as the existence of significant links between the early microbiota, the development of the mucosal immune system and the growth and health of newborn calves [28, 29] . Given that newborn calves are most susceptible to intestinal diseases, these data allow us to develop potential strategies for manipulating early microbiota to improve animal health and performance.

The high mortality rate in calves caused by intestinal infections, coupled with pressure to reduce the use of antibiotics due to their harmful effects and the growing number of antibiotic-resistant bacteria, has led to the need to develop alternatives to antibiotics, namely drugs that improve the intestinal health of newborn calves through manipulation. intestinal microbiota, primarily enriching it with beneficial microorganisms. Numerous studies have established that the possibility of manipulating the potential of the microbiota to obtain long-term effects in adult life occurs immediately after birth, when it is not yet fully formed. By later time periods in cattle, as well as in humans, it becomes more stable [30, 31] and it is more difficult to influence [29] . Manipulating the gut microbiota early in life may be an option to improve calf health [29] as it determines the development of the intestinal epithelium, mucosal layer, immune cell status and reduces the risk of colonization by pathogens [32] . There is also a relationship between small intestinal microbiota and immune function, health and growth of calves [33] .

The most widely used yeast as a probiotic is *Saccharomyces cerevisiae*. The most effective of them are *S. cerevisiae boulardii*, rich in various biologically active substances, including those that have not yet been sufficiently studied, performing many functions: improving production performance, promoting intestinal development, regulating the balance of intestinal microflora, increasing immunity and improving the quality of livestock products [34] and helping to reduce nitrogen excretion. *S. boulardii* has potential probiotic activity due to its ability to produce organic acids, essential enzymes, vitamins, and other important metabolites such as vanillic acid, phenylethyl alcohol, and erythromycin. *S. boulardii* has a wide range of anticarcinogenic, antibacterial, antiviral and antioxidant activities, and also reduces serum cholesterol levels. They are used mainly for the preventive treatment of infectious diseases of the gastrointestinal tract and to stimulate the immune system [35] .

Yeast *Saccharomyces boulardii* are the most popular commercial probiotic. They are considered conspecific with budding yeast *S. cerevisiae*, commonly used in classical foods and have an almost identical genome sequence. A distinctive feature is the ability to produce at 37° C an unusually high level of acetic acid, which strongly inhibits the growth of bacteria, which is most

likely associated with strain-specific mutations within the same species, giving a selective advantage to this organism both in its ecological niche and in use as a probiotic [36] .

Its phenotypic differences from *S. cerevisiae* , such as acid and heat resistance, make it a suitable drug for the intestinal microenvironment and for the relief of symptoms of gastrointestinal infections [37] .

Supplementation of 0.5% *S. cerevisiae* to the diet of Simmental beef cattle increased daily gain by 9.68%, economic benefit by 9.09%, and also reduced feed costs [38] . In addition, *S. cerevisiae* can optimize the composition of the microbial environment, improve the rumen fermentation function, stabilize the rumen pH value, stimulate the metabolism of lactic acid bacteria, increase the activity of fibrinolytic enzymes in the rumen, and promote the breakdown of fibrous substances. The *S. cerevisiae* cell wall may inhibit proliferation. harmful bacteria, thereby regulating rumen function [39] .

Similar results were obtained in the case of feeding other farm animals and poultry.

Daniela Klein - J ö bstl et al. (2019) [43] showed that adding a probiotic based on *Saccharomyces cerevisiae* to the diet of calves in an amount of 19 g/day over 42 days, starting in the first two days of life, contributed to an increase in the concentration of metabolites involved in protecting animals against inflammation, as well as a decrease in fecal pH, which may indicate increased fermentation in the hindgut. At the same time, the productivity, nutritional status and health of newly weaned bulls improved. In studies, the effectiveness of yeast supplements was more evident the longer they were taken.

Live yeast and yeast feed ingredients.

Marketed as live yeast, including viable "active dry yeast" containing approximately 95% dry matter, the action of which is determined by its function in the reticulo-rumen, where it helps to increase pH, reduce lactic acid, improve fiber digestion and increase production of protein and volatile fatty acids, which, in combination with other strategies to control the risk of acidosis, improves the health of lactating cows [44, 45] and by-products of yeast fermentation, which do not contain live yeast, but include dead cells, fermentation medium and various fermentation connections. Weaned calves fed active dried yeast (ADY) demonstrated higher digestibility of crude protein and neutral detergent fiber, while increases in serum glucose, superoxide dismutase, immunoglobulins A and M, and interleukin 10 were noted. growth, ruminal fermentation, nutrient digestibility, antioxidant capacity and immune response [46] . Shown, that the addition of ASD to the diet of low-fed beef cattle at a dose of 4 g/head per day changes the composition of the microbiota, bringing it closer to the composition observed in cattle fed a normal diet, and promotes a similar carcass weight. This is due to the activation of the process of nitrogen utilization and improved growth rates of animals [47] . In a high concentrate diet, ASD supplementation improved alpha diversity and relative abundance of rumen bacteria, amino acid and carbohydrate metabolism, terpenoids and polyketides, lipid metabolism, as well as energy metabolism in rumen bacteria [48] . It was also noted that when ASD is introduced into the diet of dairy goats, it increases the number of rumen cellulolytic bacteria and the activity of nitrogen utilization enzymes and immune status [49] .

Among yeast products, their cultures are of particular interest, since they contain, in addition to yeast organisms, their metabolites formed during certain fermentation processes. Yeast cultures promote digestion and absorption and enhance metabolic activity [50] . At the same time, the activity of xylanase, endoglucanase, fibrinoglycogenase and cellulase in the rumen of beef cattle significantly increases, which indicated that the yeast culture improves the digestibility of roughage for ruminants by increasing the activity of enzymes in the rumen. It has been shown that yeast and their derivatives can have a beneficial effect on the growth and health of animals, especially when they are in unfavorable conditions , as well as during *Salmonella* infection [51] . Thus, the addition of chrome yeast can potentially mitigate the negative effects of heat stress in dairy cows, which may result in increased milk yield and increased milk protein content and lactation rates improve [52] . Their combination with biologically active peptides, amino acids and niacin, acting as a "glucose tolerance factor", plays the role of a physiological activator action of

insulin to improve carbohydrate metabolism [53]. Selenium yeast plays a unique role in regulating animal metabolism, improving animal health, and increasing serine content in meat and eggs compared to non-organic feeding [54].

However, when yeast is used as a substitute for antibiotics in livestock, results vary depending on several factors, including the species of yeast, components of the yeast product, feed ingredients, category of animal, type of symptoms, and differences in rearing conditions [55].

Numerous yeast additives and yeast feed ingredients are manufactured, sold and used in feed as sources of nutrients, probiotics, and suppliers of nutraceutical compounds including cell wall polysaccharides such as β -glucan and mannan, which perform a variety of biological functions: enhancing immunity, improving antigenicity, stress relief, stimulation of growth and development [56].

In recent years, metabolic products secreted by living microorganisms or released after their lysis, called postbiotics, with anti-inflammatory, immunomodulatory, antiobesity, antihypertensive, hypocholesterolemic, antiproliferative and antioxidant activity have attracted attention. The concept of postbiotics, evidence of their health benefits and possible signaling pathways involved in their protective effect, as well as prospects for use in foods and pharmaceuticals, are reviewed in J. E. _ Aguilar - Toal á et al. [57]. Postbiotics are distinguished by a clear chemical structure, safety, long shelf life and the content of various signaling molecules. The exact mechanisms of their action are not fully understood, but the data obtained suggest that postbiotics can help improve the health of the host by enhancing specific physiological functions. The health benefits of postbiotics are thought to be due to modification of the intestinal microbiota, competitive attachment to the mucosa and epithelium, improvement of epithelial barrier function, and modulation of the immune system [58–60]. Postbiotics, which are mixtures of intermediates and end products of microbial fermentation, are currently being investigated as non-antibiotic growth promoters [61].

A striking example of postbiotics that have a comprehensive positive effect is the product of anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) [62]. SCFP is one example of an effective postbiotic that, when administered to the diet, enriches it with a mixture of metabolites such as lysed cellular components, amino acids, lipids, volatile fatty acids and B vitamins, which improve rumen development, feed intake, and the health and growth of test subjects animals [59, 63, 64] examined the effects of a *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial preparation (DFM) on growth performance, whole blood immune gene expression, serum biochemistry, and plasma metabolome of newly weaned beef steers. This study demonstrated that using a basal diet supplemented with 19 g of DFM daily over a 42-day supplementation period improved their performance, nutritional status and health. Analysis of the plasma metabolome revealed an increase in the concentration of metabolites, 5-methylcytosine and indoleacrylic acid, involved in protecting animals from inflammation. There was a trend toward lower fecal pH in steers fed this diet, which may indicate increased hindgut fermentation. The effect of SCFP products on improving the growth and health of calves can be attributed to their ability to modulate the microbiota in the gastrointestinal tract. A high-throughput sequencing study of the effects of SCFPs on microbial communities in each gastrointestinal tract in Holstein calves showed that their inclusion in the diet increased the diversity of microbial species in the large intestine, rumen and rectum, and stimulated colonization by fibrolytic bacteria (*Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*) in the rumen and colon [65]. A study on the effects of SCFP conducted in the first 56 days of life in Holstein bulls showed an improvement in gastrointestinal morphology, possibly due to an increase in *Butyrivibrio* and a decrease in *Prevotella* in the rumen fluid, leading to increased butyrate production [64]. SCFPs also attenuate the effects of increased ruminal and peripheral bacterial endotoxin concentrations and inflammation resulting from subacute rumen acidosis, a metabolic disorder in dairy cows associated with dysbiosis of the rumen and hindgut microbiota [66].

Yeast protein preparations, characterized by low production costs while maintaining the highest food quality standards, can also be used in the food industry to replace conventional food protein[67].

Conclusion

Modern realities dictate the need to develop new, more environmentally friendly methods than the use of antibiotics, to maintain a healthy microbiota in the gastrointestinal tract of both humans and farm animals. One of the most progressive methods in this regard seems to be the use of probiotic microorganisms. If previously most of the research was focused on probiotic bacteria, over the past few years more and more attention has been paid to the probiotic properties of yeast organisms, which are characterized by ease of cultivation, greater efficiency and adaptability to damaging conditions in the gastrointestinal tract of the host organism. The use of yeast in the form of probiotic, prebiotic and postbiotic preparations has proven effective both in stimulating the growth of farm animals and poultry and in preventing the development of intestinal pathogens in them. A number of authors have shown that, despite the insufficient study of postbiotic yeast preparations, their already identified properties, such as a clear chemical structure, resistance to various damaging factors, the possibility of long-term storage, and most importantly, a positive effect on specific physiological functions of the host organism, put them forward in first place among biological factors stimulating the growth and development of living organisms. The results of research by various authors suggest that their use will expand in various areas of the biotechnology industry.

References:

- 1 Jahn L.J., Rekdal V.M. and Sommer M.O. Microbial foods for improving human and planetary health. *Cell*, 2023, 186(3): 469-478. ([https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(22\)01515-X.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(22)01515-X.pdf))
- 2 Graham A.E. and Ledesma-Amaro R.. The microbial food revolution. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2231. (<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37891-1>)
3. Matassa S. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial biotechnology*, 2016, 9(5): 568-575. (<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12369>)
- 4 Ritala A. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol* 8, 2009. 2017. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>)
- 5 Choi K.R., Yu H.E. and Lee S.Y. Microbial food: microorganisms repurposed for our food. *Microbial biotechnology*, 2022, 15(1): 18-25. (<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13911>)
- 6 Salazar-López N.J. Single-cell protein production as a strategy to reincorporate food waste and agro by-products back into the processing chain. *Bioengineering*, 2022, 9(11):623. (<https://doi.org/10.3390/bioengineering9110623>) (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112596>)
- 7 Alves S.C. Microbial meat: A sustainable vegan protein source produced from agri-waste to feed the world. *Food Research International*, 2023, 166: 112596. (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112596>)
- 8 Pérez-Santaescobal C. Modern food production: Fundamentals, sustainability, and the role of technological advances. *Sustainable production technology in food*, 2021: 1-22. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821233-2.00003-4>)
- 9 Alugongo G. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of dairy science*, 2017, 100(2): 1189-1199. (<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11399>)
- 10 Hsiung R. T. In vitro properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13: 113-124.
- 11 Klopp R. Effects of feeding *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on the health and growth performance of Holstein dairy calves. *JDS communications*, 2022, 3(3): 174-179.
- 12 Dibner J. and Richards J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science*, 2005.,84(4): 634-643. (<https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>)
- 13 Diarra M.S. and Malouin F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front Microbiol* 2014, 5: 282. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00282>)

- 14 Arowolo M.A. and He J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 241-249. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.010>)
- 15 Halfen J. Effects of yeast culture supplementation on lactation performance and rumen fermentation profile and microbial abundance in mid-lactation Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(11): 11580-11592. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19996>)
- 16 Garcia-Mazcorro J. The health enhancer yeast *Saccharomyces cerevisiae* in two types of commercial products for animal nutrition. *Letters in applied microbiology*, 2019, 68(5): 472-478. (<https://doi.org/10.1111/lam.13141>)
- 17 Elghandour M.M. Prospect of yeast probiotic inclusion enhances livestock feeds utilization and performance: An overview. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022: 1-13. (<https://doi.org/10.1007/s13399-022-02562-6>)
- 18 Obeidat B.S. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation during the suckling period on performance of Awassi ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 2023, 55(3): 140. (<https://doi.org/10.1007/s11250-023-03555-x>)
- 19 Maynard C.L. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 2012, 489(7415): 231-241. (<https://doi.org/10.1038/nature11551>)
- 20 Pardon B. Longitudinal study on morbidity and mortality in white veal calves in Belgium. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 1-15. (<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-26>)
- 21 Scott K. Risk factors identified on arrival associated with morbidity and mortality at a grain-fed veal facility: A prospective, single-cohort study. *Journal of dairy science*, 2019, 102(10): 9224-9235. (<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16829>)
- 22 Svensson C. and Hultgren J. Associations between housing, management, and morbidity during rearing and subsequent first-lactation milk production of dairy cows in southwest Sweden. *Journal of dairy science*, 2008, 91(4): 1510-1518. (<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0235>)
- 23 Windeyer M. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive veterinary medicine*, 2014, 113(2): 231-240. (<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.019>)
- 24 Agyare C. Antibiotic use in poultry production and its effects on bacterial resistance. *Antimicrobial resistance—A global threat*, 2018: 33-51. (<https://doi.org/10.5772/intechopen.79371>)
- 25 Gritz E.C. and Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in pediatrics*, 2015, 3: 17. (<https://doi.org/10.3389/fped.2015.00017>)
- 26 Korpela K. and W.M. de Vos. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Current opinion in microbiology*, 2018, 44: 70-78. (<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.06.003>)
- 27 Sommer F. and Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature reviews microbiology*, 2013, 11(4): 227-238. (<https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>)
- 28 Yáñez-Ruiz D.R., Abecia L. and Newbold C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 1133. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01133>)
- 29 Malmuthuge N. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(7): 5996-6005. (<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12239>)
- 30 Klein-Jöbstl D., Iwersen M. and Drillich M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of dairy science*, 2014, 97(8): 5110-5119. (<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7695>)
- 31 Lim E.S., Wang D. and Holtz L.R. The bacterial microbiome and virome milestones of infant development. *Trends in microbiology*, 2016, 24(10): 801-810. (<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.001>)
- 32 Chaucheyras-Durand F. and Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 2010, 1(1): 3-9. (<https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>)
- 33 Amin N. and Seifert J. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 989-1001. (<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.035>)
- 34 Bin D. Research progress on application of *Saccharomyces cerevisiae* in animal production. *Feed Res*, 2019, 7: 114-116.

- 35 Abid R. Probiotic yeast *Saccharomyces*: Back to nature to improve human health. *Journal of Fungi*, 2022, 8(5): 444. (<https://doi.org/10.3390/jof8050444>)
- 36 Offei B. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome research*, 2019, 29(9): 1478-1494. (<https://doi.org/10.1101/gr.243147.118>)
- 37 Sen S. and Mansell T.J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 137: 103333. (<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>)
- 38 Gao H. Effects of dietary supplementation of yeast culture on productive performance and economic benefits of beef cattle. *Animal Husbandry and Feed Science (Inner Mongolia)*, 2017, 38(7): 45-50. (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173271422>)
- 39 Tian Q. Effects of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* on the expression of SBD-1 in cultured ruminal epithelial cells of sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(5): 927-934. (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183184672>)
- 40 Elghandour M. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *Journal of applied microbiology*, 2020, 128(3): 658-674. (<https://doi.org/10.1111/jam.14416>)
- 41 Dunière L. Changes in digestive microbiota, rumen fermentations and oxidative stress around parturition are alleviated by live yeast feed supplementation to gestating ewes. *Journal of Fungi*, 2021, 7(6): 447. (<https://doi.org/10.3390/jof7060447>)
- 42 Ogbuewu I.P. and Mbajiorgu C.A. Meta-analysis of *Saccharomyces cerevisiae* on enhancement of growth performance, rumen fermentation and haemato-biochemical characteristics of growing goats. *Heliyon*, 2023, 9(3). (<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14178>)
- 43 Klein-Jöbstl D. Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PloS one*, 2019, 14(8): e0220554. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220554>)
- 44 Shurson G. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal feed science and technology*, 2018, 235: 60-76. (<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>)
- 45 Plaizier J. Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*, 2018, 12(s2): s399-s418. (<https://doi.org/10.1017/S1751731118001921>)
- 46 Ma J. Active dry yeast supplementation improves the growth performance, rumen fermentation, and immune response of weaned beef calves. *Animal Nutrition*, 2021, 7(4): 1352-1359. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.006>)
- 47 Liu S. Effects of dry yeast supplementation on growth performance, rumen fermentation characteristics, slaughter performance and microbial communities in beef cattle. *Animal Biotechnology*, 2022, 33(6): 1150-1160. (<https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1878204>)
- 48 Gao K. and Geng C. Alterations in the rumen bacterial communities and metabolites of finishing bulls fed high-concentrate diets supplemented with active dry yeast and yeast culture. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 908244. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.908244>)
- 49 Zhang J. Active dry yeast supplementation benefits ruminal fermentation, bacterial community, blood immunoglobulins, and growth performance in young dairy goats, but not for intermittent supplementation. *Animal Nutrition*, 2023, 13: 289-301. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.02.001>)
- 50 Gao J. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science*, 2008, 87(7): 1377-1384. (<https://doi.org/10.3382/ps.2007-00418>)
- 51 Brewer M.T. Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary microbiology*, 2014, 172(1-2): 248-255. (<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.026>)
- 52 Wo Y. Plasma metabolic profiling reveals that chromium yeast alleviates the negative effects of heat stress in mid-lactation dairy cows. *Animal Nutrition*, 2023, 13: 401-410. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.01.012>)
- 53 Pechova A. and Pavlata L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinárni medicína*, 2007, 52(1): 1-18. (DOI: 10.17221/2010-VETMED)
- 54 Mohrekes M. Effects of three methods of oral selenium-enriched yeast supplementation on blood components and growth in Holstein dairy calves. *Animal Production Science*, 2018, 59(2): 260-265. (<https://doi.org/10.1071/AN16417>)

- 55 Pang Y. Yeast probiotic and yeast products in enhancing livestock feeds utilization and performance: An overview. *Journal of Fungi*, 2022, 8(11):1191. (<https://doi.org/10.3390/jof8111191>)
- 56 Kuntsova M. Obtaining yeast mannoproteins with antimicrobial properties. *Functional Foods in Health and Disease*, 2023, 13(9): 437-447. (<https://doi.org/10.31989/ffhd.v13i9.1179>)
- 57 Aguilar-Toalá J. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in food science & technology*, 2018, 75: 105-114.
- 58 Bermudez-Brito M., et al., Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2012, 61(2): 160-174. (<https://doi.org/10.1159/000342079>)
- 59 Adeyemi, J.A. Effects of a blend of *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial and fermentation products in the diet of newly weaned beef steers: growth performance, whole-blood immune gene expression, serum biochemistry, and plasma metabolome. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(11): 4657-4667. (<https://doi.org/10.1093/jas/skz308>)
- 60 Soren S. *Saccharomyces cerevisiae* based postbiotics: Assessment of their effects on the health and productive performance of poultry. 2023. (<https://www.researchgate.net/publication/373923180>)
- 61 Salminen S. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(9): 649-667. (<https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>)
- 62 Centeno-Martinez R.E. Effects of feeding *Saccharomyces cerevisiae* fermentation postbiotic on the fecal microbial community of Holstein dairy calves. *Animal Microbiome*, 2023, 5(1): 13. (<https://doi.org/10.1186/s42523-023-00234-y>)
- 63 Magalhães V. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of dairy science*, 2008, 91(4): 1497-1509. (<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0582>)
- 64 Xiao J. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(7): 5401-5412. (<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10563>)
- 65 Xiao J. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on the microbial community throughout the gastrointestinal tract of calves. *Animals*, 2018, 9(1): 4. (<https://doi.org/10.3390/ani9010004>)
- 66 Guo J. *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products reduce bacterial endotoxin concentrations and inflammation during grain-based subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(3): 2354-2368. (<https://doi.org/10.3168/jds.2021-20572>)
- 67 Jach M.E., et al., Yeast protein as an easily accessible food source. *Metabolites*, 2022, 12(1): 63. (<https://doi.org/10.3390/metabo12010063>)

М.Г. САУБЕНОВА¹, А. РАПОПОРТ², Е.А. ОЛЕЙНИКОВА¹,
С.В. МАКСИМОВИЧ^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹

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

²Микробиология және биотехнология институты, Рига, Латвия

МАЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫНДА ЖЕМШӨП АШЫТҚЫСЫН ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ ТУЫНДЫЛАРЫН ҚОЛДАНУДЫҢ ТИІМДІЛІГІ

Түйін

Бірқатар объективті себептерге байланысты, ең бастысы - жер шары тұрғындарының тұрақты өсуі, сондай-ақ ауыл шаруашылығы өндірісін табысты жүргізуді қиындататын климаттық жағдайлардың айқын өзгеруі, әлемде ауылшаруашылық жануарлары үшін азық-түлік пен жемшөптің айтарлықтай тапшылығы байқалады, бұл олардың өндірісін жедел ұлғайту қажеттілігін көрсетеді. Азық-түлік пен жемдік ақуыздың жетіспеушілігін толтыру, сондай-ақ ауылшаруашылық жануарларының денсаулығына белгілі бір әсер ететін және әртүрлі табиғаттың зиянды факторларына қарсы тұру мүмкіндігін көрсететін бірқатар биологиялық белсенді заттарды алу мәселесінің оңтайлы шешімі микроорганизмдер биомассасының биотехнологиялық өндірісінің қуаттылығын арттыру болып табылады [1, 2]. Бұл қойылған міндеттерді шешудің жалпыға бірдей танылған нұсқасы бір жасушалы ақуызды өндіру болып табылады [3-5]. Бір жасушалы биомассада соямен (38,6%), балықпен (17,8%), етпен (21,2%) және толық сүтпен (3,28%) салыстырғанда ақуыздың жоғары пайызы (30-80%) бар, ол маңызды аминқышқылдарының, соның ішінде метионин, треонин және лизиннің көзі болып табылады [6]. Микроорганизмдер көміртегі көзінің

төмендігіне, жерге, суға тәуелділіктің төмендігіне және қолайлы тамақтану профілімен біріктірілген маусымдық ауытқуларға байланысты жаңа тамақ көзі ретінде назар аударды. Қазіргі уақытта микробтық ақуызды өндірудің әлеуетті технологиялары, оның артықшылықтары, қауіпсіздігі және оны қолданумен байланысты шектеулер және кең ауқымды енгізу перспективалары сыни тұрғыдан қарастырылуда [7]. Бұл сондай-ақ өзекті мәселе, себебі азық-түлік ақуыздарымен қамтамасыз етудің дәстүрлі ауылшаруашылық жолы жеткіліксіз ғана емес, сонымен қатар қоршаған ортаға теріс әсер етуі мүмкін, сондықтан оны қайта қарау керек [8].

Кілтті сөздер: май, пробиотиктер, қазандық қоспалар, постбиотиктер.

МРНТИ: 34.27.51; 68.39.15

М.Г. САУБЕНОВА¹, А. РАПОПОРТ², Е.А. ОЛЕЙНИКОВА¹,
С.В. МАКСИМОВИЧ^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ¹

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

²Институт микробиологии и биотехнологии, Рига, Латвия

*e-mail: seveg@ya.ru

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.04

Аннотация

По ряду объективных причин, основными из которых является неуклонный рост населения земного шара, а также ярко выраженное изменение климатических условий, затрудняющих успешное ведение сельскохозяйственного производства, миру грозит существенный дефицит продуктов питания и кормов для сельскохозяйственных животных, что свидетельствует о необходимости срочного наращивания их производства. Оптимальным решением проблемы восполнения дефицита пищевого и кормового белка, а также получения ряда биологически активных веществ, проявляющих определенное воздействие на здоровье сельскохозяйственных животных и возможность противодействия повреждающим факторам различной природы, представляется увеличение мощностей биотехнологического производства биомассы микроорганизмов [1, 2]. Общеизвестным вариантом решения поставленных задач является производство белка одноклеточных [3-5]. Биомасса одноклеточных содержит более высокий процент белка (30-80%) по сравнению с соей (38,6%), рыбой (17,8%), мясом (21,2%) и цельным молоком (3,28%), является источником незаменимых аминокислот, в том числе метионина, треонина и лизина [6]. Микроорганизмы привлекли внимание как новый источник пищи из-за их низкого углеродного следа, низкой зависимости от земли, воды и сезонных колебаний в сочетании с благоприятным профилем питания. В настоящее время критически рассматриваются потенциальные технологии производства микробного белка, его преимущества, безопасность и ограничения, связанные с его использованием, а также перспективы более широкого крупномасштабного внедрения [7]. Это актуально еще и потому, что традиционный сельскохозяйственный путь снабжения пищевыми животными белками не только недостаточен, но может оказывать отрицательное воздействие и на окружающую среду и потому должен быть пересмотрен [8].

Ключевые слова: дрожжи, пробиотики, кормовые добавки, постбиотики.

Дрожжи как пробиотики

Лучшими микроорганизмами в производстве белка одноклеточных признаны дрожжи, превосходящие бактерии и водоросли по простоте получения биомассы, высокому содержанию белка (около 50% от сухой биомассы) и аминокислот, низкому содержанию нуклеиновых кислот, а также по способности расти при различных уровнях кислотности. Их физиологические особенности, такие как устойчивость к желчным солям и кислотам и

связанная с этим возможность выживания в желудочно-кишечной среде, гидрофобность клеточной поверхности, способность к аутоагрегации, антиоксидантная активность и активность β -галактозидазы позволили рассматривать дрожжевые организмы как весьма эффективные пробиотики *in vivo* [9-11].

Последнее представляет особый интерес из-за распространения устойчивости к антибиотикам у подавляющего большинства живых эукариотических организмов и биологической угрозы для здоровья человека и животных, что привело к необходимости отказа от них в качестве стимуляторов роста и профилактических мер в животноводстве. Поскольку эта мера была чревата снижением показателей роста и повышением смертности животных в результате ряда заболеваний [12, 13] возникла острая необходимость разработки альтернативного подхода к профилактике инфекционных заболеваний и стимулированию роста и здоровья животных.

В этом плане все более популярными для улучшения здоровья сельскохозяйственных животных и повышения их продуктивности признаны пробиотики или микробы прямого кормления, проявившие большой потенциал для повышения рентабельности животноводства. Пробиотики - микробные культуры, их экстракты, ферментные препараты или их комбинации - при их введении в адекватных количествах улучшается состояние здоровья организма хозяина, модулируя микробную среду кишечника, характер ферментации, поступление питательных веществ и усвояемость рациона [14, 15].

Наряду с пробиотиками на основе бактериальных штаммов широко используются дрожжи, в основном, *Saccharomyces cerevisiae* (SC) [15, 16], благотворное влияние которых на животных во многом связано с тем, что они стимулируют развитие микроорганизмов рубца, а также воздействуют на общее состояние здоровья и продуктивность [17, 18].

С самого начала жизни стерильный желудочно-кишечный тракт новорожденных млекопитающих колонизируется разнообразными микроорганизмами, на что оказывает влияние, прежде всего, инокуляция из родовых путей матери [19], условия, при которых происходит процесс родов, диета, а также применяемые в животноводстве профилактические противомикробные препараты. Многочисленными исследованиями установлено, что наиболее критическим для телят является период их перевода от преимущественно молочной диеты к получению твердого корма, осуществляемый за короткий срок. По некоторым данным, смертность от диареи в этот период доходит до 25- 87% [20, 21]. У выживших телят отмечается замедленный рост и в дальнейшем снижение продуктивности [22, 23], что связано не только с метаболической адаптацией, но и с большими изменениями в микробиоте кишечника [24].

Микробиота кишечника уже на раннем этапе развития организма животного имеет важное метаболическое значение [25], она воздействует на энергетический обмен [26] и оказывает большое влияние на созревание адаптивной и врожденной иммунной системы [19, 27], что отражается в показателях производительности в дальнейшей жизни, а также в устойчивости к различным заболеваниям. В ряде работ обсуждены факторы, определяющие рост микроорганизмов, колонизирующихся в рубце, формирование комменсальной микробиоты после отъема от груди, а также наличие существенных связей между ранней микробиотой, развитием иммунной системы слизистых оболочек и ростом и здоровьем новорожденных телят [28, 29]. С учетом того, что новорожденные телята наиболее восприимчивы к кишечным заболеваниям, эти данные позволяют разработать потенциальные стратегии для манипулирования ранней микробиотой с целью улучшения здоровья и продуктивности животных.

Высокая смертность телят, вызванная кишечными инфекциями, а также давление, направленное на сокращение использования антибиотиков в силу их вредного воздействия и растущим увеличением количества устойчивых к ним бактерий, привели к необходимости разработки средств альтернативных антибиотикам, а именно препаратов, улучшающих здоровье кишечника новорожденных телят путем манипулирования микробиотой кишечника, прежде всего обогащением его полезными микроорганизмами.

Многочисленными исследованиями установлено, что возможность манипуляций потенциалом микробиоты для получения долгосрочных эффектов во взрослой жизни имеет место сразу после рождения, когда она еще сформирована не полностью до конца. К более поздним временным периодам у крупного рогатого скота, также как и у людей, она становится более стабильной [30, 31] и на нее труднее влиять [29]. Манипулирование микробиотой кишечника в раннем возрасте может стать вариантом улучшения здоровья телят [29], поскольку он определяет развитие кишечного эпителия, слоя слизистой оболочки, состояние иммунных клеток и снижает риск колонизации патогенными микроорганизмами [32]. Отмечается также взаимосвязь между микробиотой тонкой кишки и иммунной функцией, здоровьем и ростом телят [33].

Наиболее широко в качестве пробиотиков используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Наиболее действенными из них признаны *S. cerevisiae boulardii* богатые различными биологически активными веществами, в том числе еще не достаточно изученными, выполняющие множество функций: улучшение производственных показателей, содействие развитию кишечника, регулирование баланса кишечной микрофлоры, повышение иммунитета и улучшение качества продукции животноводства [34] и способствующие уменьшению выделения азота. *S. boulardii* обладают потенциальной пробиотической активностью благодаря их способности производить органические кислоты, незаменимые ферменты, витамины и другие важные метаболиты, такие как ванилиновая кислота, фенилэтиловый спирт и эритромицин. *S. boulardii* обладает широким спектром антиканцерогенной, антибактериальной, противовирусной и антиоксидантной активности, а также снижает уровень холестерина в сыворотке крови. Они используются, в основном, для профилактического лечения инфекционных заболеваний ЖКТ и для стимуляции иммунной системы [35].

Дрожжи *Saccharomyces boulardii* являются наиболее популярным коммерческим пробиотиком. Они считаются конспецифичными с почкующимися дрожжами *S. cerevisiae*, обычно используемыми в классических пищевых продуктах, и имеют почти идентичную последовательность генома. Отличительной особенностью является способность продуцировать при +37°C необычайно высокий уровень уксусной кислоты, сильно ингибирующей рост бактерий, что связано, вероятнее всего, со штаммоспецифичными мутациями внутри одного и того же вида, дающими селективное преимущество этому организму как в его экологической нише, так и при применении в качестве пробиотика [36].

Его фенотипические отличия от *S. cerevisiae*, такие как устойчивость к кислоте и повышенной температуре, делают его подходящим препаратом для микроокружения кишечника и для облегчения симптомов инфекций ЖКТ [37].

Добавление 0,5% *S. cerevisiae* в рацион симментальского мясного скота увеличивало дневной прирост на 9,68%, экономический эффект - на 9,09%, а также снижало затраты корма [38]. Кроме того, *S. cerevisiae* может оптимизировать состав микробной среды, улучшить функцию ферментации рубца, стабилизировать значение pH рубца, стимулировать метаболизм молочнокислых бактерий, повышать активность фибринолитических ферментов в рубце и способствовать расщеплению волокнистых веществ. Клеточная стенка *S. cerevisiae* может ингибировать пролиферацию вредных бактерий, тем самым регулируя функцию рубца [39].

Аналогичные результаты были получены в случае кормления других сельскохозяйственных животных и птицы [40-42].

Daniela Klein-Jöbstl и др.(2019) [43] показали, что добавление в рацион телят пробиотика на основе *Saccharomyces cerevisiae* в количестве 19г/день в течение 42 дней, начиная с первых двух дней жизни, способствовало увеличению концентрации метаболитов, участвующих в защите животных против воспаления, а также снижению pH в фекалиях, что может указывать на усиление ферментации в задней части кишечника. При этом улучшалась продуктивность, пищевой статус и здоровье только что отлученных от

груди бычков. В исследованиях эффективность дрожжевых добавок была более очевидной по мере увеличения продолжительности их приема.

Живые дрожжи и дрожжевые кормовые ингредиенты

На рынке предлагаются как живые дрожжи, в том числе жизнеспособные «активные сухие дрожжи», содержащие около 95% сухого вещества, действие которых определяется их функцией в ретикуло-рубце, где они способствуют повышению pH, снижению содержания молочной кислоты, улучшению переваривания клетчатки и увеличению продукции белка и летучих жирных кислот, что в сочетании с другими стратегиями по контролю риска ацидоза улучшает состояние здоровья лактирующих коров [44, 45], так и побочные продукты дрожжевого брожения, не содержащие живых дрожжей, но включающие мертвые клетки, ферментационную среду и различные ферментационные соединения. Телята-отъемыши, получавшие активные сухие дрожжи (АСД), демонстрировали более высокую перевариваемость сырого белка и нейтральной детергентной клетчатки, при этом в сыворотке крови было отмечено увеличение содержания глюкозы, супероксиддисмутазы, иммуноглобулинов А и М и интерлейкина 10. При этом было отмечено улучшение показателей роста, ферментации в рубце, усвояемости питательных веществ, антиоксидантной способности и иммунного ответа [46]. Показано, что добавление АСД в рацион мясного скота, получавшего низкий уровень питания, в дозе 4г/голову в день, меняет состав микробиоты, приближая его к составу, отмечаемому в организме скота, получавшего нормальный рацион питания, и способствует получению аналогичного веса туши. Это происходит из-за активизация процесса утилизации азота и улучшения показателей роста животных [47]. При диете с высоким содержанием концентратов добавление АСД улучшало альфа-разнообразие и относительную численность бактерий рубца, метаболизм аминокислот и углеводов, терпеноидов и поликетидов, липидный обмен, а также энергетический метаболизм у бактерий рубца [48]. Отмечено также, что при введении АСД в рацион молочных коз увеличивается численность рубцовых целлюлолитических бактерий и активность ферментов использования азота и иммунного статуса [49].

Среди дрожжевых продуктов особый интерес представляют их культуры, поскольку они содержат помимо дрожжевых организмов и их метаболиты, образующиеся в ходе определенных процессов ферментации. Культуры дрожжей способствуют пищеварению и всасыванию, а также усиливают метаболическую активность [50]. При этом в рубце мясного скота значительно увеличивается активность ксиланазы, эндоглюканызы, фибриногликогеназы и целлюлазы, что указывало на то, что культура дрожжей улучшает усвояемость грубого корма жвачных животных за счет повышения активности ферментов в рубце. Показало, что дрожжи и их производные могут оказывать благотворное влияние на рост и здоровье животных, особенно когда они находятся в неблагоприятных условиях, а также при сальмонеллезной инфекции [51]. Так, добавление хромовых дрожжей потенциально может смягчить негативные последствия теплового стресса у молочных коров, в результате чего могут возрастать удои, увеличивается содержание молочного белка и улучшаются показатели лактации [52]. Их сочетание с биологически активными пептидами, аминокислотами и ниацином, действующее как «фактор толерантности к глюкозе», играет роль физиологического активатора действия инсулина для улучшения углеводного обмена [53]. Селеновые дрожжи играют уникальную роль в регулировании метаболизма животных, улучшении здоровья животных и повышении содержания серина в мясе и яйцах по сравнению с неорганическим кормлением [54].

Однако, когда дрожжи используются в качестве заменителя антибиотиков для скота, результаты варьируются в зависимости от нескольких факторов, включая вид дрожжей, компоненты дрожжевого продукта, кормовые ингредиенты, категорию животных, тип симптомов и различия в условиях выращивания [55].

Многочисленные дрожжевые добавки и дрожжевые кормовые ингредиенты производятся, продаются и используются в кормах в качестве источников питательных

веществ, пробиотиков, поставщиков нутрицевтических соединений в том числе полисахаридов клеточной стенки, таких как β -глюкан и маннан, выполняющих множество биологических функций: усиление иммунитета, улучшение антигенности, снятие стресса, стимуляция роста и развития [56].

В последние годы привлекли внимание продукты метаболизма, секретируемые живыми микроорганизмами или высвобождаемые после их лизиса, получившие название постбиотиков, обладающие противовоспалительной, иммуномодулирующей, антиожирительной, антигипертензивной, гипохолестеринемической, антипролиферативной и антиоксидантной активностью. Концепция постбиотиков, доказательства их пользы для здоровья и возможных сигнальных путей, участвующих в их защитном эффекте, а также перспективы применения в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах рассмотрены в обзоре J.E. Aguilar-Toalá et al. [57]. Постбиотики отличаются четкой химической структурой, безопасностью, длительным сроком хранения и содержанием различных сигнальных молекул. Точные механизмы их действия до конца не выяснены, однако полученные данные позволяют предположить, что постбиотики могут способствовать улучшению здоровья хозяина за счет усиления конкретных физиологических функций. Предполагается, что в основе полезных для здоровья эффектов постбиотиков лежит модификация микробиоты кишечника, конкурентное прикрепление их к слизистой оболочке и эпителию, улучшение барьерной функции эпителиальной оболочки и модуляция иммунной системы [58-60]. Постбиотики, представляющие собой смесь промежуточных и конечных продуктов микробной ферментации, в настоящее время исследуются в качестве неантибиотических стимуляторов роста [61].

Ярким примером постбиотиков, оказывающим всестороннее положительное воздействие, является продукт анаэробной ферментации *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP) [62]. SCFP является одним из примеров эффективного постбиотика, который при его введении в рацион обогащает его смесью метаболитов, таких как лизированные клеточные компоненты, аминокислоты, липиды, летучие жирные кислоты и витамины группы B, улучшающие развитие рубца, потребление корма, а также здоровье и рост подопытных животных [59, 63, 64]. Исследовали влияние микробиологического препарата прямого кормления на основе *Saccharomyces cerevisiae* (DFM) на показатели роста, экспрессию иммунных генов в цельной крови, биохимию сыворотки и метаболом плазмы вновь отнятых от груди мясных бычков. Это исследование продемонстрировало, что использование базальной диеты с добавлением 19 г DFM ежедневно в течение 42-дневного периода приема улучшило их производительность, состояние питания и здоровье. Анализ метаболома плазмы выявил увеличение в ней концентрации метаболитов, 5-метилцитозина и индолеакриловой кислоты, участвующих в защите животных от воспаления. Наблюдалась тенденция к более низкому показателю pH фекалий у бычков, получавших такой рацион, что может указывать на усиление ферментации в задней кишке. Эффект продуктов SCFP на улучшение роста и здоровья телят можно объяснить их способностью модулировать микробиоту в желудочно-кишечном тракте. Изучение влияния SCFP на микробные сообщества в каждом участке ЖКТ с использованием техники высокопроизводительного секвенирования, проведенное на телятах голштинской породы, показало, что их включение в рацион увеличивало разнообразие видов микробов в толстом кишечнике, а также в рубце и прямой кишке, а также стимулировало колонизацию фибролитическими бактериями (*Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*) в рубце и толстой кишке [65]. Исследование влияния SCFP, проведенное в первые 56 дней жизни бычков голштинской породы, показало улучшение морфологии ЖКТ, возможно, из-за увеличения количества *Butyrivibrio* и уменьшения содержания *Prevotella* в рубцовой жидкости, что вело к увеличению выработки бутирата [64]. SCFP ослабляют также влияние увеличенной концентрации рубцового и периферического бактериального эндотоксина и воспаления, возникающих в результате подострого рубцового ацидоза – метаболического нарушения у дойных коров, связанного с дисбиозом микробиоты рубца и задней кишки [66].

Дрожжевые белковые препараты, отличающиеся низкими производственными затратами при соблюдении высочайших стандартов качества пищевых продуктов, могут быть использованы также в пищевой промышленности для замены обычного пищевого белка [67].

Заключение

Современные реалии диктуют необходимость разработки новых, более экологически чистых, чем применение антибиотиков, способов поддержания здоровой микробиоты в желудочно-кишечном тракте, как человека, так и сельскохозяйственных животных. Одним из наиболее прогрессивных методов в этом плане представляется применение пробиотических микроорганизмов. Если ранее большая часть исследований была сосредоточена на пробиотических бактериях, то за последние несколько лет все большее внимание уделяется пробиотическим свойствам дрожжевых организмов, отличающихся простотой выращивания, большей эффективностью и приспособленностью к повреждающим условиям существования в ЖКТ организма-хозяина. Использование дрожжей в виде пробиотических, пребиотических и постбиотических препаратов доказало свою эффективность, как в отношении стимулирования роста сельскохозяйственных животных и птицы, так и в предотвращении развития у них кишечных патогенов. Рядом авторов показано, что, несмотря на недостаточную изученность постбиотических дрожжевых препаратов, их уже выявленные свойства, такие как четкая химическая структура, устойчивость к различным повреждающим факторам, возможность длительного хранения, а главное, положительное воздействие на конкретные физиологические функции организма-хозяина, выдвигают их на первое место среди биологических факторов стимуляции роста и развития живых организмов. Результаты исследований различных авторов позволяют ожидать расширения их использования в различных областях биотехнологической промышленности.

Литература:

- 1 Jahn L.J., Rekdal V.M. and Sommer M.O. Microbial foods for improving human and planetary health. *Cell*, 2023, 186(3): 469-478. ([https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(22\)01515-X.pdf](https://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(22)01515-X.pdf))
- 2 Graham A.E. and Ledesma-Amaro R.. The microbial food revolution. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2231. (<https://doi.org/10.1038/s41467-023-37891-1>)
3. Matassa S. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial biotechnology*, 2016, 9(5): 568-575. (<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12369>)
- 4 Ritala A. Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Front Microbiol* 8, 2009. 2017. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>)
- 5 Choi K.R., Yu H.E. and Lee S.Y. Microbial food: microorganisms repurposed for our food. *Microbial biotechnology*, 2022, 15(1): 18-25. (<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13911>)
- 6 Salazar-López N.J. Single-cell protein production as a strategy to reincorporate food waste and agro by-products back into the processing chain. *Bioengineering*, 2022, 9(11):623. (<https://doi.org/10.3390/bioengineering9110623>) (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112596>)
- 7 Alves S.C. Microbial meat: A sustainable vegan protein source produced from agri-waste to feed the world. *Food Research International*, 2023, 166: 112596. (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112596>)
- 8 Pérez-Santaescobal C. Modern food production: Fundamentals, sustainability, and the role of technological advances. *Sustainable production technology in food*, 2021: 1-22. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821233-2.00003-4>)
- 9 Alugongo G. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of dairy science*, 2017, 100(2): 1189-1199. (<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11399>)
- 10 Hsiung R. T. In vitro properties of potential probiotic indigenous yeasts originating from fermented food and beverages in Taiwan. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13: 113-124.
- 11 Klopp R. Effects of feeding *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on the health and growth performance of Holstein dairy calves. *JDS communications*, 2022, 3(3): 174-179.

- 12 Dibner J. and Richards J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science*, 2005.,84(4): 634-643. (<https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>)
- 13 Diarra M.S. and Malouin F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front Microbiol* 2014, 5: 282. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00282>)
- 14 Arowolo M.A. and He J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. *Animal Nutrition*, 2018, 4(3): 241-249. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.010>)
- 15 Halfen J. Effects of yeast culture supplementation on lactation performance and rumen fermentation profile and microbial abundance in mid-lactation Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(11): 11580-11592. (<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19996>)
- 16 Garcia-Mazcorro J. The health enhancer yeast *Saccharomyces cerevisiae* in two types of commercial products for animal nutrition. *Letters in applied microbiology*, 2019, 68(5): 472-478. (<https://doi.org/10.1111/lam.13141>)
- 17 Elghandour M.M. Prospect of yeast probiotic inclusion enhances livestock feeds utilization and performance: An overview. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022: 1-13. (<https://doi.org/10.1007/s13399-022-02562-6>)
- 18 Obeidat B.S. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation during the suckling period on performance of Awassi ewes. *Tropical Animal Health and Production*, 2023, 55(3): 140. (<https://doi.org/10.1007/s11250-023-03555-x>)
- 19 Maynard C.L. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 2012, 489(7415): 231-241. (<https://doi.org/10.1038/nature11551>)
- 20 Pardon B. Longitudinal study on morbidity and mortality in white veal calves in Belgium. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8: 1-15. (<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-26>)
- 21 Scott K. Risk factors identified on arrival associated with morbidity and mortality at a grain-fed veal facility: A prospective, single-cohort study. *Journal of dairy science*, 2019, 102(10): 9224-9235. (<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16829>)
- 22 Svensson C. and Hultgren J. Associations between housing, management, and morbidity during rearing and subsequent first-lactation milk production of dairy cows in southwest Sweden. *Journal of dairy science*, 2008, 91(4): 1510-1518. (<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0235>)
- 23 Windeyer M. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive veterinary medicine*, 2014, 113(2): 231-240. (<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.019>)
- 24 Agyare C. Antibiotic use in poultry production and its effects on bacterial resistance. *Antimicrobial resistance—A global threat*, 2018: 33-51. (<https://doi.org/10.5772/intechopen.79371>)
- 25 Gritz E.C. and Bhandari V. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in pediatrics*, 2015, 3: 17. (<https://doi.org/10.3389/fped.2015.00017>)
- 26 Korpela K. and W.M. de Vos. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Current opinion in microbiology*, 2018, 44: 70-78. (<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.06.003>)
- 27 Sommer F. and Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature reviews microbiology*, 2013, 11(4): 227-238. (<https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>)
- 28 Yáñez-Ruiz D.R., Abecia L. and Newbold C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 1133. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01133>)
- 29 Malmuthuge N. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(7): 5996-6005. (<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12239>)
- 30 Klein-Jöbstl D., Iwersen M. and Drillich M. Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: A case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of dairy science*, 2014, 97(8): 5110-5119. (<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7695>)
- 31 Lim E.S., Wang D. and Holtz L.R. The bacterial microbiome and virome milestones of infant development. *Trends in microbiology*, 2016, 24(10): 801-810. (<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.001>)
- 32 Chaucheyras-Durand F. and Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 2010, 1(1): 3-9. (<https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>)

- 33 Amin N. and Seifert J. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 989-1001. (<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.035>)
- 34 Bin D. Research progress on application of *Saccharomyces cerevisiae* in animal production. *Feed Res*, 2019, 7: 114-116.
- 35 Abid R. Probiotic yeast *Saccharomyces*: Back to nature to improve human health. *Journal of Fungi*, 2022, 8(5): 444. (<https://doi.org/10.3390/jof8050444>)
- 36 Offei B. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome research*, 2019, 29(9): 1478-1494. (<https://doi.org/10.1101/gr.243147.118>)
- 37 Sen S. and Mansell T.J. Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 137: 103333. (<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>)
- 38 Gao H. Effects of dietary supplementation of yeast culture on productive performance and economic benefits of beef cattle. *Animal Husbandry and Feed Science (Inner Mongolia)*, 2017, 38(7): 45-50. (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173271422>)
- 39 Tian Q. Effects of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* on the expression of SBD-1 in cultured ruminal epithelial cells of sheep. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(5): 927-934. (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183184672>)
- 40 Elghandour M. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive to non and pseudo-ruminant feeding: a review. *Journal of applied microbiology*, 2020, 128(3): 658-674. (<https://doi.org/10.1111/jam.14416>)
- 41 Dunière L. Changes in digestive microbiota, rumen fermentations and oxidative stress around parturition are alleviated by live yeast feed supplementation to gestating ewes. *Journal of Fungi*, 2021, 7(6): 447. (<https://doi.org/10.3390/jof7060447>)
- 42 Ogbuewu I.P. and Mbajiorgu C.A. Meta-analysis of *Saccharomyces cerevisiae* on enhancement of growth performance, rumen fermentation and haemato-biochemical characteristics of growing goats. *Heliyon*, 2023, 9(3). (<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14178>)
- 43 Klein-Jöbstl D. Microbiota of newborn calves and their mothers reveals possible transfer routes for newborn calves' gastrointestinal microbiota. *PloS one*, 2019, 14(8): e0220554. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220554>)
- 44 Shurson G. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal feed science and technology*, 2018, 235: 60-76. (<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>)
- 45 Plaizier J. Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*, 2018, 12(s2): s399-s418. (<https://doi.org/10.1017/S1751731118001921>)
- 46 Ma J. Active dry yeast supplementation improves the growth performance, rumen fermentation, and immune response of weaned beef calves. *Animal Nutrition*, 2021, 7(4): 1352-1359. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.06.006>)
- 47 Liu S. Effects of dry yeast supplementation on growth performance, rumen fermentation characteristics, slaughter performance and microbial communities in beef cattle. *Animal Biotechnology*, 2022, 33(6): 1150-1160. (<https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1878204>)
- 48 Gao K. and Geng C. Alterations in the rumen bacterial communities and metabolites of finishing bulls fed high-concentrate diets supplemented with active dry yeast and yeast culture. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 908244. (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.908244>)
- 49 Zhang J. Active dry yeast supplementation benefits ruminal fermentation, bacterial community, blood immunoglobulins, and growth performance in young dairy goats, but not for intermittent supplementation. *Animal Nutrition*, 2023, 13: 289-301. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.02.001>)
- 50 Gao J. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science*, 2008, 87(7): 1377-1384. (<https://doi.org/10.3382/ps.2007-00418>)
- 51 Brewer M.T. Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary microbiology*, 2014, 172(1-2): 248-255. (<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.026>)
- 52 Wo Y. Plasma metabolic profiling reveals that chromium yeast alleviates the negative effects of heat stress in mid-lactation dairy cows. *Animal Nutrition*, 2023, 13: 401-410. (<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.01.012>)

- 53 Pechova A. and Pavlata L. Chromium as an essential nutrient: a review. *Veterinárni medicína*, 2007, 52(1): 1-18. (DOI: 10.17221/2010-VETMED)
- 54 Mohrekeş M. Effects of three methods of oral selenium-enriched yeast supplementation on blood components and growth in Holstein dairy calves. *Animal Production Science*, 2018, 59(2): 260-265. (<https://doi.org/10.1071/AN16417>)
- 55 Pang Y. Yeast probiotic and yeast products in enhancing livestock feeds utilization and performance: An overview. *Journal of Fungi*, 2022, 8(11):1191. (<https://doi.org/10.3390/jof8111191>)
- 56 Kuntsova M. Obtaining yeast mannoproteins with antimicrobial properties. *Functional Foods in Health and Disease*, 2023, 13(9): 437-447. (<https://doi.org/10.31989/ffhd.v13i9.1179>)
- 57 Aguilar-Toalá J. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in food science & technology*, 2018, 75: 105-114.
- 58 Bermudez-Brito M., et al., Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2012, 61(2): 160-174. (<https://doi.org/10.1159/000342079>)
- 59 Adeyemi, J.A. Effects of a blend of *Saccharomyces cerevisiae*-based direct-fed microbial and fermentation products in the diet of newly weaned beef steers: growth performance, whole-blood immune gene expression, serum biochemistry, and plasma metabolome. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(11): 4657-4667. (<https://doi.org/10.1093/jas/skz308>)
- 60 Soren S. *Saccharomyces cerevisiae* based postbiotics: Assessment of their effects on the health and productive performance of poultry. 2023. (<https://www.researchgate.net/publication/373923180>)
- 61 Salminen S. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(9): 649-667. (<https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>)
- 62 Centeno-Martinez R.E. Effects of feeding *Saccharomyces cerevisiae* fermentation postbiotic on the fecal microbial community of Holstein dairy calves. *Animal Microbiome*, 2023, 5(1): 13. (<https://doi.org/10.1186/s42523-023-00234-y>)
- 63 Magalhães V. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of dairy science*, 2008, 91(4): 1497-1509. (<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0582>)
- 64 Xiao J. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(7): 5401-5412. (<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10563>)
- 65 Xiao J. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on the microbial community throughout the gastrointestinal tract of calves. *Animals*, 2018, 9(1): 4. (<https://doi.org/10.3390/ani9010004>)
- 66 Guo J. *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products reduce bacterial endotoxin concentrations and inflammation during grain-based subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(3): 2354-2368. (<https://doi.org/10.3168/jds.2021-20572>)
- 67 Jach M.E., et al., Yeast protein as an easily accessible food source. *Metabolites*, 2022, 12(1): 63. (<https://doi.org/10.3390/metabo12010063>)

IRSTI: 76.29.57

A.T. ABISHEV¹, M.Kh. DZHUSUPGALIEVA^{1*}, M.K. GABASOVA¹,
A.Zh. ZHUMABEKOVA¹, S.S. YAKUSHENKO²

¹Kazakh Scientific Center of Dermatology and Infectious Diseases, Almaty, Kazakhstan

²State Health Institution Regional Dermatological Dispensary, Lipetsk, Russian Federation

*e-mail: dzhusupgalieva@ mail.ru

FEATURES OF GENOMIC AND PHENOTYPIC VARIABILITY OF *NEISSERIA GONORRHOEAE* SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL DRUGS

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.05

Abstract

According to domestic and foreign researchers, gonococcal infection in recent years has been an urgent problem throughout the world, due to the emergence and spread of strains characterized by multiple drug resistance to antimicrobial drugs. The review presents the results of studies on the sensitivity of circulating strains in Kazakhstan and countries of the near and far abroad.

An earlier study of the antibiotic resistance profile of the Kazakh population of *Neisseria gonorrhoeae* showed that the least active antibiotic against the studied strains of *Neisseria gonorrhoeae* was penicillin (29.7%), the most active was ceftriaxone (0.7% - resistant and 1.3% - moderately resistant strains). Analysis of the genetic heterogeneity of Kazakh isolates *Neisseria gonorrhoeae* showed that the 16S-23S ribosomal intergenic spacer of *Neisseria gonorrhoeae* strains has low intraspecific variability.

Currently, research is ongoing in most countries of the world aimed at studying the ways of spreading antibiotic-resistant strains of gonococci, and molecular mechanisms for the development of resistance, which will allow in the near future to determine the localization and nature of mutations leading to the development of resistance.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, antimicrobials, antibiotic susceptibility, multidrug resistance, genetic heterogeneity.

Every year, according to the World Health Organization (WHO), there is a high incidence of gonococcal infection [1].

The fact that gonococcal infections are often young people of childbearing age means that this is a particularly pressing problem, which further affects fertility. Another important problem is that the resistance of *N.gonorrhoeae* strains to antimicrobial drugs, which has been found regularly in recent decades, is increasing every year [2].

The draft Global Health Sector Strategy on Sexually Transmitted Infections focuses on *Neisseria gonorrhoeae*, which requires urgent action due to the growing risk of incurable forms of the disease [3].

Long-term monitoring of antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* has been carried out by WHO in the Western Pacific Region (WPR) to optimize the treatment of gonococcal infection with antibiotics since 1992. The Gonococcal Antimicrobial Drugs Surveillance Program (GASP) has been in operation since 2007 [4] and is currently being implemented in 67 countries on 5 continents with the support of WHO [5]. The Russian Federation has been implementing a domestic version of this program recognized by the world community RU-GASP (Russian gonococcal antimicrobial susceptibility program) since 2002 [6], initiated in the Russian Federation by the State Scientific Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Ministry of Health of Russia.

According to observations, the resistance of *N.gonorrhoeae* to antibiotics is growing everywhere.

In Kazakhstan, studies were conducted to study the antibiotic resistance of *N.gonorrhoeae* strains, which showed that the sensitivity of circulating strains in the region was characterized by

significant heterogeneity. Temporary changes in the sensitivity of *N.gonorrhoeae* to antimicrobial drugs were observed.

Resistance to erythromycin (57%), tetracycline (60%), kanamycin (47%), and the number of multiple-resistant (56.1-69%) strains of *N.gonorrhoeae* increased, but sensitivity to penicillin and its derivatives remained [7]. In this regard, it was necessary to obtain data on the resistance of gonococci to antimicrobial drugs in the Republic of Kazakhstan in modern conditions. From 2009 to 2011, studies were conducted to study the profile of antibiotic resistance of the causative agent of gonococcal infection to the main antimicrobial drugs and the genetic heterogeneity of the Kazakh population of *N.gonorrhoeae*.

As a result of the study of sensitivity to antimicrobial drugs, it turned out that penicillin was the lowest active preparation for *N.gonorrhoeae* strains (the percentage of resistant strains was about 30%), followed in descending order by tetracycline (about 35% - resistant and more than 47% - moderately resistant) and ciprofloxacin (33% - resistant and more than 41% are moderately resistant). The most active antibiotic against *N.gonorrhoeae* was ceftriaxone (up to 1% - resistant and more than 1.2% - moderately resistant) [8,9]. The analysis of genetic heterogeneity of Kazakhstani *N.gonorrhoeae* isolates was carried out, which showed that the 16S-23S ribosomal intergenic spacer of *Neisseria gonorrhoeae* strains has low intraspecific variability. Two large groups of isolates, which include DNA – No. 2,5,8,13,16,18,26,36,37 and the second group No. 1, 4,14,15,29,33, and reference strains from GENE BANK – were identified.

The outcome of the research showed at least four suitable loci (potential VNTR loci in the *Neisseria gonorrhoeae* genome) oligonucleotide primers for amplification of these loci were designed.

A detailed analysis of 98 isolates of *N.gonorrhoeae* resistant to ciprofloxacin to determine the presence of changes in the regions of the *gyrA* and *ragS* genes that determine resistance to quinolones and analysis of the melting curves of amplification products for the *gyrA* and *ragS* genes showed that more careful ordering or the use of an additional oligonucleotide is necessary to determine mutations in the *gyrA* gene by analyzing the melting curves-samples complementary to the locus with mutations for the analysis of melting of heteroduplexes.

The spectrum of a change in the *ragS* gene. Analysis of the melting curves of PCR products for the *ragS* gene can be used to determine mutations in this gene. The comparison of samples with mutations in the *gyrA* and *ragS* genes with the previously obtained dendrograms revealed that samples containing mutations do not form separate clusters on any of the dendrograms, which means that these mutations have arisen recently [10-13].

Since 2004, following the standards of the World Health Organization, the National Program of Antimicrobial Surveillance of Gonococci (RU-GASP) has been operating in the Russian Federation, where the current state for 2015 is presented. It included links between the sensitivity of *N.gonorrhoeae* to antibiotics, determinants of primary genetic resistance, and sequence types of specific strains.

124 strains of *N. gonorrhoeae* obtained from 9 regions of Russia in that year were tested using *N. gonorrhoeae* multi-antigen typing (NG-MAST) – an antimicrobial susceptibility test by the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), criteria and oligonucleotide microarray for the identification of mutations in the *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA* and *parC* genes responsible for resistance to penicillin G, tetracycline and fluoroquinolones. Genogroup (G) isolates were evaluated based on their sequence types (ST) *porB* and *tbpB*.

In Russia, when analyzed by NG-MAST, there are 58 sequences of *N.gonorrhoeae*, 35 of which were described for the first time, showing a diversified population. 807, 1544, 1993, 5714, 9476, and 12531 SCs, for some regions typical of the Russian Federation and several countries of the former USSR, were represented by 5 or more isolates. The ST 1407 strain, which is widespread throughout the world, was represented by one strain in the present study. The division into genogroups facilitated the study of associations between the type of sequence *N. gonorrhoeae*, antimicrobial resistance spectra, and content of genetic resistance determinants. Susceptible (G-807, G-12531) and resistant (G-5714, G-9476) genogroups were previously identified.

These outcomes led researchers to conclude that resistance or intermediate susceptibility to previously recommended antimicrobials such as penicillin G (60.5%), ciprofloxacin (41.1%), and tetracycline (25%) is common in *N. gonorrhoeae* population. Based on previous results and modern data, ceftriaxone and spectinomycin must be recommended first of all as an empiric antimicrobial monotherapy for gonorrhea in Russia [14].

In 2016, researches were conducted to study the regional sensitivity of *N. gonorrhoeae* strains in the Central District of St. Petersburg, which showed a higher stage of resistance of gonococci to penicillin, tetracycline and ciprofloxacin (75.0; 62.5 and 50.0% of resistant strains respectively), while maintaining the sensitivity of the pathogen to ceftriaxone, cefixime, pectinomycin and azithromycin (0; 0; 6.3; 6.3 resistant strains, respectively); to ceftriaxone, cefixime, spectinomycin and azithromycin (0; 0; 6.3; 6.3 resistant strains, respectively). Studies confirm the need for constant monitoring of antibiotic resistance of the causative agent of gonococcal infection in each region of the Russian Federation [15].

The sensitivity of 365 *N. gonorrhoeae* strains isolated in 2015-2016 was studied in 8 regions of the Russian Federation, the Republic of Tatarstan, and the Chuvash Republic, as a result of which a high sensitivity of the studied isolates was established to ceftriaxone (100%) and spectinomycin (98.9%) and in some regions of the Russian Federation - a significant variation in sensitivity to benzylpenicillin, tetracycline, ciprofloxacin, and azithromycin.

Consequently, the outcome of the research made it possible to establish a pronounced heterogeneity of *N. gonorrhoeae* strains circulating in the territory of the Russian Federation. The information obtained may be used as additions to the federal list of AMPs used in the treatment of gonococcal infection.

Molecular typing of the above strains showed a significant diversity of the modern Russian population of *N. gonorrhoeae*. The most numerous strains identified in most regions were characterized by sensitivity to all tested AMPs. Multidrug-resistant sequence types were inferior to them in number and were associated with a certain subject of the Russian Federation [16].

Other research scientists made a valuation of the level of resistance to tetracycline in the modern population of *N. gonorrhoeae* in the Russian Federation, where this drug was excluded from the treatment regimen for gonococcal infections in 2003. All were analyzed for the presence of genetic markers involved in tetracycline resistance (chromosomal hereditary variations of *porB*, *rpsJ*, and *mtrR* genes and the *tetM* gene located on a plasmid) from 2015 to 2017. In one isolate of *N. gonorrhoeae*, a defective *tetM* gene with a deletion of AG at position 1239-1240 was found, and a new stop codon was introduced, which led to a disruption of TetM protein synthesis and decreased resistance to tetracycline. Phylogenetic trees set up using the *N. gonorrhoeae* NG-MAST and *tetM* loci were compared. A complex relationship was studied between the *N. gonorrhoeae* sequence type and the *tetM* plasmid type. There was a partial renewal of the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to tetracycline relative to the proportion of isolates with resistance identified 10 years ago (75%) [17].

Antimicrobial resistance (AMR) and molecular epidemiology of *N. gonorrhoeae* isolates cultured in 2012 (n =84) and 2017 (n =72) were studied for the first time to update the Kyrgyz National Guidelines for the treatment of gonorrhea in Kyrgyzstan. Sequence typing of the *N. gonorrhoeae* multiantigen (NG-MAST) was executed.

Gonococcal isolates were defined to 69 sequence types, 52 (75.4%) of which were new. The high genetic diversity of the populations of gonococci cultivated in Kyrgyzstan in 2012 and 2017 has shown. Ceftriaxone 500-1000 mg in combination with azithromycin 2 g or doxycycline is suggested as primary empirical therapy, especially if chlamydial infection has not been excluded. Spectinomycin 2 g may be an alternative treatment and may be given with azithromycin 2 g if gonorrhea of the pharynx has not been excluded. The use of fluoroquinolones, aminoglycosides, benzylpenicillin, or tetracyclines for empiric treatment of gonorrhea is not suggested in Kyrgyzstan. The researchers concluded that it is important to keep up-to-date and strictly follow national guidelines for treating gonorrhea based on quality-assured AMR data. Expanded and brought up observation for gonococcal AMR in Kyrgyzstan is very important [18].

In Belarus, from 2010 to 2013, the prevalence and dynamics of AMR of gonococci, as well as the molecular and epidemiological characteristics of *N.gonorrhoeae* strains, were studied.

The consequences of this surveillance were put in place to replace penicillin G with ceftriaxone (1 g one-time intramuscularly) as the primary empiric treatment for gonorrhea in the national treatment guidelines in Belarus to strengthen surveillance for gonococcal AMR further, and to study treatment failure and molecular epidemiological genotypes in Belarus [19].

In China, studies were conducted from 2017 to 2018 to find multidrug-resistant isolates of *N. gonorrhoeae* with combined resistance to ceftriaxone and azithromycin, which made it possible to detect a rare strain with multidrug resistance to the above drugs (GC250) and four strains (GC185, GC195, GC196 and GC249) with resistance to ceftriaxone and reduced sensitivity to azithromycin. All strains belonged to NG-STAR ST1143, including the mosaic penA- 60.001, which is strongly associated with ceftriaxone resistance. Characterization of AMR determinants and phylogenetic analysis of research showed that these five strains were closely related to the ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* that are spreading worldwide. FC428, however, with a higher MIC (Minimum Inhibitory Concentration) for azithromycin. The outcomes achieved showed that this clone not only initiated clonal expansion in China but also acquired resistance to azithromycin [20].

In the Western Pacific region, where there is a high occasion of gonorrhea, AMR strains of *N.gonorrhoeae* pose a serious threat to human health, thereby causing particular related to researchers in this region [21]. Since there are no genomic epidemiological studies of this pathogen in the Philippines, it was defined to put up the Program for the Surveillance and Genomic Surveillance of Clinical Strains of *N. gonorrhoeae*, AMR (ARSP), isolated in the Philippines. This Program has been collecting data on resistant gonorrhea since 1996.

Jamoralin M.C. Jr. et al. [22] sequenced the complete genomes of 21 isolates of *N. gonorrhoeae* collected by ARSP in 2013–2014. Multilocus sequence type, multiantigen sequence type, presence of antimicrobial resistance determinants, and relatedness among isolates were derived from sequence data. The correspondence between phenotypic and genotypic resistance was also determined. 10 of 21 isolates were resistant to penicillin, ciprofloxacin, and tetracycline, mainly due to the presence of S91F heritable variability in the bla TEM gene, gyrA, and tetM gene, respectively. No one of the isolates was constant to ceftriaxone or cefixime. Concordance between phenotypic and genotypic impedance in general was 92.38% for 5 antibiotics of 4 classes. Comparisons with global genomes placed Philippine genomes in the global A sequence and led to the identification of an international distribution pathway. This is the first genomic research of *N. gonorrhoeae*. Isolates collected by ARSP are used to contextualize prospective epidemiological surveillance. It highlights the importance of genomic surveillance in the Western Pacific and other endemic regions to understand the spread of drug-resistant gonorrhea worldwide [22].

Jianhe Peng et al. [23] developed a quantitative, scalable proteomics approach to better understand AMR in *N. gonorrhoeae* to study a WHO panel with complete closed genome sequencing of *N. gonorrhoeae* isolates and well-defined phenotypic and genotypic antimicrobial drug resistance patterns. Normalized reproducible protein expression profiles were detected in *N.gonorrhoeae* reference strains. The strains described by genomics showed similarities however showed different proteomic profiles. Several proteins from efflux pumps to stress responses, such as oxidative stress, and toxin/antitoxin systems, have been found to be modified in AMR strains. LtgE was increased in strains showing chromosomally indirect resistance to penicillin. MacB (ATP hydrolysis component of the macrolide efflux pump MacA-B) almost doubled in WHO V (azithromycin MIC > 256 mg/l) and may be associated with azithromycin resistance.

The researchers have invented a reliable method for researching protein expression in *N.gonorrhoeae*. Proteome profiles can distinguish amongst genetically similar patches. This study has detected complex mechanisms in *N. gonorrhoeae* that may be associated with AMR.

N. gonorrhoeae has several mobile genetic elements (MGEs). MGEs can make an influence on the pathogenesis and spread of AMR in *N.gonorrhoeae* [24]. Phylogenetic research specifies uncertainties about the genetic connection of isolates with identical phenotypes and provides data

on whether AMR is caused by new mutations and clonal expansion or by isolated introductions by importation.

Katy Town et al. [25] sequenced 1277 isolates with relevant epidemiological and antimicrobial susceptibility information compiled from 2013 to 2016 to research the genomic variation of *N.gonorrhoeae* in England. Comparing genetic markers and phenotypes for AMR, the researchers detected 2 *N.gonorrhoeae* lines with various antimicrobial susceptibility profiles and 3 clusters with elevated MICs for ceftriaxone, different mutations in the penA allele, and various epidemiological characteristics. These outcomes recommended that *N. gonorrhoeae* with reduced antimicrobial susceptibility arises independently and repeatedly in the different reproductive systems in England through new mutation or recombination occurrence, as well as through importation. Monitoring and control of *N. gonorrhoeae* AMR should cover all affected populations and not concentrate on specific risk groups or positions.

In this scope, the purpose of the research carried out by Miguel Pinto et al. [26], is the clustering *N. gonorrhoeae* into genogroups based on WGS information to increase prospective laboratory surveillance. Especially, it aims to detect the main circulating WGS genogroups in Europe and set up the relationship between them and AMR.

It enriches the public databases by adding WGS information from Portuguese isolates spanning fifteen years of follow-up. The genomes of 3791 fully sequenced *N. gonorrhoeae* isolates collected across Europe were analyzed using a gene-by-gene approach (ie, using cgMLST). Analysis of the composition and stability of the cluster made it possible to classify isolates in compliance with a two-stage hierarchical level of the genogroup, identified by two thresholds of allelic range, showing the stability of the cluster.

Genogroup clustering is broadly consistent with available *N. gonorrhoeae* typing methods (i.e. MLST (multi-locus sequence typing), NG-MAST (multi-antigen sequence typing of *N.gonorrhoeae*) and PubMLST core genome groups) and highlight the dominant genogroups circulating in Europe and showed that the vast majority of genogroups show a dominant AMPT profile.

Moreover, the non-static gene-by-gene approach, combined with a more discriminatory threshold for potential epidemiological association, made it possible for the researchers to compare information with previous outbreak reports or chains of transmission.

Genogroup assignment allows for a comprehensive analysis of the genetic diversity of *N. gonorrhoeae* and observation of WGS-based genogroups existing in Europe while facilitating the valuation (and ongoing monitoring) of their frequency, geographic distribution, and potential connection with specific AMR signatures.

This strategy could benefit human health work by prioritizing the genogroups to be controlled, detecting emerging resistance carriers, and potentially facilitating information sharing and communication [26].

Tatum D. Mortimer, Yonatan H. Grad [27] register the diffused acquisition of *N. gonorrhoeae* resistance to many classes of antibiotics, and the emergence worldwide of lines with reduced susceptibility to currently suggested treatments. The researchers disputed the contribution of WGS to understanding *N.gonorrhoeae* resistance. Genomics has shed light on the evolutionary origin and area of population structure of *N. gonorrhoeae*, as well as the extent of horizontal gene transfer within and among *Neisseria* species. The WGS also made it possible for more detailed epidemiological research of the transmission of *N. gonorrhoeae* between individuals and populations than previously used typing methods.

N. gonorrhoeae genomics study will complement other laboratory methods to understand the biology and evolution of the pathogen, upgrade clinical diagnosis and treatment, and inform human health to limit the impact of antibiotic resistance.

The peptidoglycan composition of *Neisseria* has been of scientific interest for more than forty years. Initial studies focused on the mechanisms behind increased antibiotic resistance in *N. gonorrhoeae* by identifying differences in peptidoglycan composition between penicillin-susceptible and resistant strains. The development that cytotoxic peptidoglycan fragments are also

brought out by *Neisseria* has increased interest in the composition of peptidoglycan. This method concerns the purification, enzymatic digestion, and separation of peptidoglycan fragments using high-performance liquid chromatography (HPLC). It also concerns the preparation of samples so that they can be accurately detected by mass spectrometry [28].

Azithromycin-insensitive strains of *N. gonorrhoeae* present a new global public health threat. From 2015 to 2018 in Argentina, the prevalence of azithromycin-insensitive gonococcal infections has grown essentially. For consideration of the genomic epidemiology and resistance mechanisms of these strains, Ricardo Ariel Gianecini et al. [29] researched the outcomes of sequencing of ninety six insensitive isolates collected in Argentina from 2005 to 2019. Phylogenomic analysis detected two major clades with limited geographic distribution and circulating in January 2015 and November 2019. These clades consist of the internationally distributed multilocus sequence types (ST) 1580 and 9363. ST1580 isolates that had a MIC of 2-4 µg/mL had mutations in 23S rRNA. Isolates of ST9363 with MICs of 2-4 or >256 µg/mL had mutations in 23S rRNA, the mtr mosaic locus, or both. Observation of the geographic distribution and characteristics of these predominant clones will guide human health policy to control the spread of azithromycin-insensitive *N. gonorrhoeae* in Argentina.

As mentioned above, Grad Y.H. et al [30] recently found that in 36% of the isolates studied, the mechanisms associated with azithromycin resistance could not be determined based on current knowledge. Moreover, researchers have long postulated the existence of a non-transformable determinant of resistance known as “factor X” that is associated with increased resistance to penicillin and other antimicrobials, but this mechanism has not been identified [31].

The incidence of *N. gonorrhoeae* is rapidly growing along with increasing stages of antibiotic resistance to a wide range of drugs, including first-line drugs. The rise of resistance has led to fears that incurable gonorrhea will cause serious disease worldwide. Daniel H F Rubin et al. [32] describe several approaches being taken to slow down and control the spread of resistance. First, several old drugs have been repurposed and new drugs are being developed that are active against *N. gonorrhoeae*. Second, the development of a vaccine, a long-important goal, is moving forward. Third, new diagnostic methods promise the rapid detection of antibiotic resistance and the transition from empiric to individualized treatment. Rolling out these new tools to tackle antibiotic resistance will require careful consideration to ensure optimal care for all patients while extending the duration of treatment regimens.

Daniel Golparian et al. [33] consider the need for AMR surveillance in *N. gonorrhoeae* confirmed by molecular typing, ideally through genome sequencing. The authors identified *N. gonorrhoeae* AMR clonal complexes (NG-STAR) and validated their usefulness for gonococcal AMR surveillance. All NG-STAR and ST alleles available in the public database were analyzed using PHYLOViZ 2.0 to determine CC according to the closest parent ST with ≥ 5 identical alleles and the parent ST with the most links. The European gonococcal dataset published in 2013 (n=1054), the 2016 WHO reference strain panel (n=14), and *N. gonorrhoeae* isolates from several countries with the ceftriaxone resistance determinant penA-60.001 (n=7) were used for verification.

The researchers decided that CC NG-STAR corresponds to the phylogeny of the gonococcus genome; allows fast visualization with limited computational requirements; provides a simple, reproducible, and portable nomenclature (for WGS data and conventional Sanger sequencing); and predicts AMR lines. Surveillance for phenotypic AMR supplemented by WGS is mandatory and NG-STAR CCs can effectively support it [33].

Ceftriaxone remains the first-line therapy for patients infected with *N. gonorrhoeae* in most cases.

Monica M. Lahra et al. [34] investigated the possible spread of ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* clone FC428 in Japan following the recent isolation of similar strains in Denmark (GK124) and Canada (47707). The authors report 2 cases of the FC428 clone in Australia in heterosexual men traveling from Asia. The researchers' bioinformatic analyses included basic phylogeny of single nucleotide variations and in silico molecular typing; phylogenetic analysis

showed a close genetic relationship among all 5 isolates. These results provide additional evidence for the international transmission of ceftriaxone-resistant *N.gonorrhoeae*. The authors recommend raising awareness of the international spread of this drug-resistant strain, strengthening surveillance, including detection of treatment failures and contacts, and increasing international data sharing.

Fa-Xing Jiang et al. [35] characterized the AMR and genetic determinants of resistance of *N.gonorrhoeae* isolates from Hefei (China), which provided extensive information on the molecular epidemiology of gonococcal resistance in China. 126 *N. gonorrhoeae* isolates from a hospital clinic in Hefei were collected between January 2014 and November 2015. MICs of *N. gonorrhoeae* isolates for seven antimicrobials were determined by the agar dilution method. The isolates were tested for mutations in the penA and mtrR and 23S rRNA genes and genotyped using *N.gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST).

Thus, *N. gonorrhoeae* isolates from Hefei from 2014 to 2015 showed a high level of AMR previously suggested for the treatment of gonorrhea, such as penicillin, tetracycline, and ciprofloxacin. The prevalence of resistance to azithromycin was also high (28.6%). No isolates were found to be completely resistant to spectinomycin, ceftriaxone, or cefixime; but, in general, 11.1% of the isolates had reduced ESC susceptibility.

Kauser Jabeen et al. [36] conducted a study on the prevalence and trends of gonococcal STIs and molecular epidemiology of local strains in Karachi, Pakistan, from 2012 to 2014. Gonococcal isolates (n=100) obtained from urogenital specimens were transferred to the laboratory of the Aga Khan University. Antimicrobial susceptibility was determined using Etest, molecular epidemiology was assessed using *N. gonorrhoeae* multi-antigen typing (NG-MAST). Quality control was performed using WHO *N. gonorrhoeae* reference strains C, F, G, K, L, M, N, O, P, and ATCC 49226.

Sensitivity to spectinomycin, ceftriaxone, and cefixime was 100%, and to azithromycin - 99%.

The authors made conclusions about the circulation in Karachi (Pakistan) in a highly diversified gonococcal population, 74 NG-MAST STs (62 new STs) with increased resistance to penicillin G, ciprofloxacin, and tetracycline. The absence of resistance to ceftriaxone was noted, which makes it possible to recommend it as the drug of choice. However, it is recommended to increase the dose of ceftriaxone from 125 mg IM to 250 mg IM due to the decrease in the MIC of ceftriaxone and the occurrence of resistance reported in the region. In addition, due to the high level of resistance to ciprofloxacin (86%), it is necessary to exclude ciprofloxacin from the recommended first-line therapy. It is critical to greatly expand the monitoring of gonococcal AMR to other laboratories and cities in Pakistan.

The development of resistance in *N. gonorrhoeae* to available first-line antibiotics, including penicillins, tetracyclines, fluoroquinolones, and cephalosporins, has led to the spread of multidrug-resistant gonorrhea on a global scale. Advances in high-throughput WGS provide useful tools that can be used to enhance the detection, treatment, and management of gonococcus, which will ultimately help in the fight against AMR gonorrhea worldwide.

Jeanine Abrams et al. [37] reviewed the use of WGS *N. gonorrhoeae* for strain typing, phylogenomic studies, molecular surveillance, and transmission studies. In their view, the development of the high-throughput WGS has revolutionized the ability to characterize and analyze microbial isolates and communities, influencing typing methods, epidemiological surveillance, genetic relatedness analysis, and transmission studies. The application of WGS tools to the study of gonococcal AMR isolates has already improved the understanding of the evolution of AMR in NG and the transmission of resistant strains at local, national, and global scales.

To contribute to the implementation of supranational requirements to monitor and control the spread of *N. gonorrhoeae* AMR, the National Institute of Health of Portugal contributed to the establishment of the National Network of *N. gonorrhoeae* Collection Laboratories (PTGonoNet). This study reports on the main trends in *N. gonorrhoeae* AMR observed from 2003 to 2018. All isolates described in this study represent an opportunistic current collection of *N. gonorrhoeae*

isolates maintained by the National Reference Laboratory for Sexually Transmitted Infections, National Institute of Health of Portugal, comprising strains isolated from 35 different public and private laboratories. The molecular type was determined using NG-MAST. AMR data from 2596 isolates distributed in the country show that 87.67% of all *N. gonorrhoeae* isolates showed reduced susceptibility to at least one antimicrobial agent. Over the years, a steady decline in sensitivity and resistance to penicillin, tetracycline, and ciprofloxacin can be observed. However, a decrease in sensitivity to cephalosporins was not observed until 2018, while for azithromycin it has always been low. The most common NG-MAST genogroups observed were G1407, G7445, G225, G2, and G1034 [38].

According to David M Whiley et al. [39], AMR *N. gonorrhoeae* is a globally recognized health threat, and new strategies are needed to improve AMR surveillance. The Northern Territory of Australia is unique in that 2 different first-line treatments are used to treat gonorrhea, primarily based on geographic location. 1629 *N. gonorrhoeae* nucleic acid amplification positive clinical specimens collected from regions where ceftriaxone plus azithromycin or amoxicillin plus azithromycin are recommended for first-line treatment were tested using 8 *N. gonorrhoeae* AMR PCR assays. The results were compared with the data of routine observation based on culture. PCR data confirmed the absence of resistance to ceftriaxone and a low level of resistance to azithromycin (0.2%), and that resistance to penicillin was <5% in the areas of amoxicillin and azithromycin. Ciprofloxacin resistance and penicillinase-producing *N. gonorrhoeae* were lower with molecular methods. The authors concluded that molecular detection of *N. gonorrhoeae* AMR could increase the evidence base for treatment recommendations, especially in settings where culture-based surveillance is limited.

Anna Carannante et al. [40] consider it useful to apply molecular epidemiology approaches to detect emerging, often resistant, gonococcal clones. In this study, 67 *N. gonorrhoeae* isolates from different anatomical regions collected over 8 years in Italy were analyzed by WGS. WGS was performed using the Illumina NextSeq 500 platform. Phylogenetic analysis was based on single nucleotide core polymorphism (SNP) and multilocus core genome sequence typing (cgMLST). Sequence typing of *N. gonorrhoeae* multiantigens (NG-MAST), MLST, and *N. gonorrhoeae* for AMR (NG-STAR) was performed in silico using WGS data. Antimicrobial susceptibility for a panel of four drugs was assessed using the gradient diffusion method. In general, gonococcal clustering was consistent with NG-MAST, MLST, NG-STAR profiles, and antimicrobial susceptibility, but not with the site of isolation, HIV status, and sexual orientation of patients. Phylogenetic analysis revealed nine clades: two of them were predominant and included gonococci of genogroups G1407 and G2400.

Rapid and comprehensive methods are needed to accurately characterize *N. gonorrhoeae* AMR profiles. Chi Zhang, Leshan Xiu, Yamei Li et al. [41] used a method based on multiplex amplicon sequencing to simultaneously sequence 13 AMR-associated genes in *N. gonorrhoeae* directly from clinical specimens.

Nine strains of *N. gonorrhoeae* were used to develop and validate the method. Eleven urethral swabs and their corresponding cultured isolates were matched in pairs to determine the accuracy of the method. To determine the sensitivity of the method, imitation samples were prepared with various dilutions. Five non-gonococcal *Neisseria* strains and 24 negative *N. gonorrhoeae* clinical specimens were used to assess cross-reactivity. The method was applied to 64 clinical samples to evaluate its effectiveness.

The authors concluded that using Sanger sequencing as a reference method, sequences recovered from amplicon sequencing had a baseline accuracy greater than 99.5%, and AMR sites were correctly identified. The limit of detection (LOD) was below 31 copies/reaction. No significant cross-reactivity was observed. In addition, target genes were successfully extracted from 64 clinical specimens, including 9 urine specimens, demonstrating the feasibility of this method in various specimen types. For clinical samples, results can be obtained within a period from 7 hours 40 minutes to 10 hours 40 minutes, while for isolates, the processing time was approximately 2 hours shorter.

The method is versatile and convenient for non-culture diagnostics with the advantages of high sensitivity and accuracy.

On the growing concern about the emergence and spread of multidrug-resistant strains *N. gonorrhoeae* reported by Ivan Bodoev and others [42]. Researchers believe that to effectively control antibiotic-resistant bacterial pathogens, it is necessary to develop new antimicrobials and understand the mechanisms of resistance to existing antibiotics. In this study, the authors found an unexpected emergence of drug resistance in *N. gonorrhoeae* caused by amino acid substitutions in the SurA periplasmic chaperone and the BamA β -stem assembly mechanism component. The clinical isolate i19.05 with mutations in the corresponding genes along with reduced sensitivity to penicillin, tetracycline, and azithromycin was studied. Mutant strain NG05 (surA mut bamA mut and penA mut) was obtained using the general sensitive clinical isolate n01.08 as a recipient in the transformation procedure. Comparative proteomic analysis of strains NG05 and n01.08 revealed a significantly increased level of other chaperones, Skp and FkpA, as well as some transport proteins. Efflux pump inhibition experiments have shown that desensitization is achieved by efflux pump activity. The authors suggest that the described mutations in the surA and bamA genes cause qualitative and quantitative changes in periplasmic chaperones, which, in turn, changes the function of synthesized cell envelope proteins.

Matthew W. Schmerer et al. [43] presented genomic characterization of *Neisseria* strains gonorrhoeae, demonstrating reduced sensitivity to azithromycin from sentinel surveillance conducted in the United States in 2016. Further Molecular Observation of *N. gonorrhoeae* isolates will reveal new mechanisms of sustainability.

The aim of Hongren Wang et al. study [44] was to test the contribution of the *N. gonorrhoeae* clone FC428, distributed worldwide, to the emergence of resistance to ceftriaxone in Chengdu in southwest China in 2018.

The antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* isolates to six antibiotics was determined by the agar dilution method. Real-time PCR and WGS analysis were used to identify clone FC428. Phylogenomic and molecular analyses of AMR have been performed to characterize the transmission and evolution of related strains.

This study confirmed that four out of 112 *N. gonorrhoeae* isolates are ceftriaxone-resistant clone FC428. Phylogenomic analysis showed that they arose as a result of numerous introductions and subsequent local transmission. The strains have undergone further evolution, characterized by the accumulation of mutations in resistance genes and/or the acquisition of plasmids encoding penicillin and tetracycline resistance genes.

The authors report the spread of *N. gonorrhoeae* FC428 in southwest China and call for efforts to strengthen gonococcal antimicrobial surveillance to control the further spread of this successful clone both locally and nationally.

The dynamics of the biology of the gonococcal population are poorly defined due to the lack of resolution in strain typing methods.

Odile B. Harrison, Ana Cehovin, Jessica Skett et al. [45] evaluated the use of the core genome to improve understanding of the structure of the gonococcal population compared to current typing schemes.

In total, 1668 loci were identified, which are the core of the gonococcal genome. They were organized into a multilocus typing scheme of the main genome sequence (*N. gonorrhoeae* cg MLST v1.0). A clustering algorithm using a threshold of 400 allelic differences between isolates allowed the separation of gonococci into discrete and stable main genome groups, some of which persisted for several decades. These groups were associated with antimicrobial genotypes and non-overlapping NG-STAR and NG-MAST sequence types. MLST-ST and were more widely distributed among major genome groups.

A group of researchers from China [46] conducted a study on ceftriaxone susceptibility testing and molecular characterization of *N. gonorrhoeae* isolates.

A total of 128 *N. gonorrhoeae* isolates were obtained consecutively in Changsha, China between April 2015 and June 2016. Ceftriaxone MICs were measured by the agar dilution method

for each isolate. Ceftriaxone resistance determinants including *penA*, *mtrR*, *porB*, and *ponA* were amplified by PCR, and the PCR products were sequenced. For genotyping, *N.gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) was performed. The results showed that 11% (14/128) of the isolates had reduced susceptibility or resistance to ceftriaxone. The results of ceftriaxone susceptibility testing indicated that ceftriaxone could continue to be recommended as a first-line treatment for gonorrhea in Changsha; however, timely AMR surveillance is important. Non-mosaic *penA* alleles with A501V/T, P551S, and *porB1b* mutations may contribute to ceftriaxone resistance or decreased *N. gonorrhoeae* susceptibility in this region, and heterogeneous STs in these isolates rule out clonal expansion of a particular subtype. The 14 isolates with reduced susceptibility or resistance were subdivided into 9 STs showing significant diversity.

AMR surveillance for *N. gonorrhoeae* is essential to monitor the emergence and spread of AMR strains in local, national, and international populations. This is critical for developing or refining treatment recommendations. *N. gonorrhoeae* multi-antigen typing (NG-MAST) is useful for describing the molecular epidemiology of gonococci at the national and international levels. Determining the determinants of AMR to beta-lactam drugs is a means of monitoring the development of resistance.

In Ghana, little is known about the prevalence of gonococcal AMR at present, and the characterization of gonococcal isolates has not previously been performed.

In a study described by Naiki Atram et al. [47] *Gonococcus* isolates (n=44) collected from five health facilities in Ghana between 2012 and 2015 were investigated using AMR testing, NG-MAST, and *penA* gene sequencing. High rates of resistance to tetracycline (100%), benzylpenicillin (90.9%), and ciprofloxacin (81.8%) were revealed. One isolate had a high MIC of cefixime (0.75 µg/mL). 28 NG-MAST sequence types (ST) were identified, seventeen of which were new. The high MIC cefixime isolate contained the *penA*-34 mosaic allele and belonged to NG-MAST ST1407, a globally widespread multidrug-resistant clone that accounts for the majority of cefixime resistance in many countries. In conclusion, AMR testing, NG-MAST, and sequencing of the AMR determinant *penA* revealed high rates of resistance to tetracycline, benzylpenicillin, and ciprofloxacin; and a very diverse population of *N.gonorrhoeae* in Ghana.

According to Xiaolin Qin et al. [48] the prevalence of *N. gonorrhoeae* infection in China has increased dramatically since 2015. AMR and molecular mobilization in *N. gonorrhoeae* are two important factors behind this growing prevalence. A total of 704 isolates were collected from two cities in Guangdong. MICs of major antimicrobials were determined and penicillinase-producing *N.gonorrhoeae* (PPNG) and tetracycline-resistant *N.gonorrhoeae* (TRNG) were characterized, and multi-antigen sequence typing of *N.gonorrhoeae* (NG-MAST) was performed. High resistance to penicillin (68.2%), tetracycline (85.7%), and ciprofloxacin (98.2%) was revealed. Spectinomycin, ceftriaxone, and azithromycin were effective, with susceptibility of 100%, 96.4%, and 90.7%, respectively. Resistance to penicillin decreased significantly from 78.4% to 73.6% and azithromycin from 11.9% to 3.7%. The overall prevalence of PPNG, TRNG, and PPNG/TRNG was 25.4%, 33.1%, and 13.4%, respectively. PPNG decreased significantly from 37.3% to 23.9%, TRNG from 50.0% to 31.3%, and PPNG/TRNG from 23.5% to 11.7%. However, the share of African-type PPNG increased significantly (from 18.4% to 64.1%) compared to the decrease in Asian-type PPNG (from 81.6% to 33.3%), while the share of US-type TRNG increased significantly (from 0% to 13.7%) compared to a decrease in Dutch type TRNG (from 100% to 86.3%). A total of 271 sequence types (STs) were identified by NG-MAST from 380 isolates collected in 2013, 2014, and 2017, with 145 new STs. The African type PPNG is increasing and replacing the Asian type, and new STs have appeared.

The researchers concluded that gonococcal isolates with new genotypes may contribute to the growth of the gonorrhea epidemic in this area.

The steady increase in antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae* requires control of the spread of resistance mutations.

Researchers from the Russian Federation [49] presented data describing drug resistance mutations, results of antimicrobial susceptibility tests, and molecular genotypes of 128 modern

N.gonorrhoeae isolates collected in 9 regions of the Russian Federation. One-third of the *N. gonorrhoeae* isolates studied contained multiple drug resistance mutations on the bacterial chromosome, resulting in a bimodal distribution of mutation profiles and associated patterns of antimicrobial susceptibility. The spread of multiple resistance can be explained by the vertical transfer of mutations leading to the clonality of the *N.gonorrhoeae* population.

N.L. Heath, R.S. Rowlands et al. [50] studied the antimicrobial activity of polyketide antibiotics against Burkholderia enacyloxin IIa and gladiolin against *N. gonorrhoeae* and *Ureaplasma* spp. Antibiotics were tested against 14 *N. gonorrhoeae* and 10 *Ureaplasma* spp, including multidrug-resistant *N. gonorrhoeae*, WHO V, WHO, and WHOS isolates, as well as *Ureaplasma* resistant to macrolides, tetracycline, and ciprofloxacin. Susceptibility testing for *N. gonorrhoeae* was performed by agar dilution, and liquid microdilution and growth kinetics assays were used for *Ureaplasma* spp. The authors concluded that the antibiotics enacyloxin IIA and gladiolin have antimicrobial activity against a number of susceptible and antibiotic-resistant isolates of *N. gonorrhoeae* and *Ureaplasma*.

The significance of this study is that it highlights the potential of a new class of antimicrobials against pathogens for which a limited number of antibiotics are available. The development of these compounds requires further study due to the emergence of broadly drug-resistant strains.

Thus, the presented review testifies to the relevance of this problem and, based on the foregoing, it can be concluded that ongoing research around the world is aimed at studying the antibiotic sensitivity of *N. gonorrhoeae* strains, identifying both strains resistant to AMR drugs and those with reduced sensitivity, analysis ways of their distribution and study of molecular mechanisms of development of resistance to AMR drugs. The ongoing studies will make it possible to determine the localization and nature of mutations that lead to the development of resistance of *N.gonorrhoeae* strains to AMR drugs, which will make it possible to increase the effectiveness of antibiotic therapy for gonococcal infection.

References:

- 1 Global'naya strategiya sektora zdravookhraneniya po infektsiyam, peredavayemym polovym putem, 2016-2021 gg. VOZ; 2016. [Global health sector strategy on Sexually Transmitted Infections, 2016-2021] (Available at: <https://www.who.int/reproductivehealth/-publications/rtis/ghss-stis/ru/>)
- 2 Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. BMC Infect Dis. 2015; 15:364. (doi: 10.1186/s12879-015-1029-2)
- 3 WHO. 69th World Health Assembly. Draft global health sector strategies. Sexually transmitted infections, 2016-2021. Report by the Secretariat: A69/33; 16 May 2016. (URL: <https://iris.who.int/handle/10665/250695>)
- 4 WHO Western Pacific Programme; South East Asian GASP, Tapsall J.W., et al. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008. Commun Dis Intell Q Rep.2010;34(1):1-7. (URL:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20521493/>)
- 5 Global'naya strategiya sektora zdravookhraneniya po infektsiyam, peredavayemym polovym putem (IPPP), na period s 2016 po 2021 g.: na puti k likvidatsii IPPP. ZHeneva: Vsemirnaya organizatsiya zdravookhraneniya; 2016 g. (URL: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/rtis/gasp_network/en)
- 6 Kubanov A.A., Rahmatulina M.R., Solomka V.S., et al. Current trends in antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Russian Federation. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya. 2016; 18(4):282-290. Russian. (Kubanov A.A., Rakhmatulina M.R., Solomka V.S., Plakhova K.I., Chestkov A.V., Petrova N.P., Deryabin D.G. Antibiotikorezistentnost' *Neisseria gonorrhoeae* v Rossiyskoy Federatsii: sovremennyye tendentsii. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2016; 18(4):282-290. (URL: https://who.int/reproductivehealth/topics/rtis/gasp_network/en)
- 7 Akyshbayeva K.S. Rol' biologicheskikh svoystv *N.gonorrhoeae* v patogeneze gonokokkovoy infektsii: avtoref. dokt.med.nauk.-Almaty, 1993.

8 Bayev A.I., Tonkonogova G.M., Zhaktayeva G.M., Sadykov G.A., Vuyko I.V., Konstantinova T.V., Uskenbayeva A.S., Aymanova A.A. Antibiotikorezistentnost' pri gonoreye. Voprosy dermatologii i venerologii, 2010, 1-2: 20-22.

9 Zhaktayeva G.M., Tonkonogova G.M., Sadykov G.A. Izucheniye profilya antibiotikorezistentnosti gonorei. Voprosy dermatologii i venerologii, 2010, 3-4:144-145.

10 Bayev A.I., Muminov T.A., Troneva A.V., Filippenko M.L. Molekulyarno-geneticheskoye tipirovaniye izolyatov *N.gonorrhoeae*, vydelennykh na territorii Respubliki Kazakhstan. Voprosy dermatologii i venerologii, 2010, 1-2:7-11.

11 Bayev A.I. Molekulyarno-geneticheskoye tipirovaniye izolyatov *N.gonorrhoeae* vydelennykh na territorii Respubliki Kazakhstan. Voprosy dermatologii i venerologii, 2010,3-4:120-122.

12 Kushnir A.V., Muminov T.A., Baev A.I., Khrapov E.A., and Filipenko M.L. Use of VNTR Typing to Test Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. Molecular genetics, Microbiology and Virology Vol. 26 No.1 2011, 27-33. (doi.org/10.3103/S0891416811010058)

13 Kushnir A.V., Baev A.I., Khrapov E.A., and Filipenko M.L. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakhstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. Infection, Genetics and Evolution 12 (2012) 570-576. (doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.026)

14 Kubanov A.A., Vorob'ev A., Chestkov A., Lejnsoo A., SHaskol'skiy B., Dement'eva E., Solomka V., Plahova K., Gryadunov S., Deryabin D. Molekulyarnaya epidemiologiya lekarstvenno-ustoychivyykh *Neisseria gonorrhoeae* v Rossii (Sovremennoye sostoyaniye, 2015 g.) Infektsionnyye bolezni, 2016, 9 avgusta; 16:389. (doi: 10.1186/s12879-016-1688-7)

15 Badikov V.D., Zakharova O.G., Yeliseyeva T.A., Krasnykh N.G. Mikrobiologicheskiye osnovy ratsional'noy antimikrobnoy terapii gonokokkovoy infektsii. V nauchno-prakticheskom zhurnale «Urologicheskkiye vedomosti». Materialy 3-y nauchno-prakticheskoy konferentsii urologov Severo-Zapadnogo federal'nogo okruga RF. Spets.vypusk.-20-21 aprelya 2017 goda, g. Sankt-Peterburg, 2017, T.7:16-17. (URL:<https://cyberleninka.ru/article/n/>)

16 Solomka V.S., Kubanov A.A., Plahova K.I., Chestkov A.V., Petrova N.P., Deryabin D.G. Antibiotikorezistentnost' *Neisseria gonorrhoeae* v Rossijskoj Federacii: regional'nye osobennosti. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya, 2017, T.19, 2:153-159. (URL: <https://cmac-journal.ru/en/publication/2016/4/>)

17 Shaskolskiy B., Dementieva E., Lejnsoo A, Petrova N., Chestkov A., Kubanov A, Dmitry Deryabin D, Gryadunov D. Tetracycline resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Russia, 2015-2017. Infect Genet Evol, 2018 Sep;63:236-242. (doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.003. Epub 2018 Jun 5)

18 Karymbaeva S., Boiko I, Jacobsson S, Mamaeva G., Ibraeva A, Usupova D., Golparian D., Unemo M. Antimicrobial resistance and molecular epidemiological typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Kyrgyzstan in Central Asia, 2012 and 2017. Infect Dis.-2021 Jun 12;21(1):559. (doi: 10.1186/s12879-021-06262-w)

19 Lebedzeu F., Golparian D., Titov L., Pankratava N, Glazkova S., Shimanskaya I., Charniakova N., Lukyanau A., Domeika M, Unemo M. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010-2013. Infect Dis.-2015 Jan 31;15:29. (doi: 10.1186/s12879-015-0755-9)

20 Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):587-613. (doi:10.1128/CMR.00010-14)

21 Yuan Q., Li Y., Xiu L., Zhang C., Fu Y., Jiang CH. 1, Tang L., Peng J. Identification of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined resistance to both ceftriaxone and azithromycin, China, 2017-2018. Emerg Microbes Infect. 2019;8(1):1546-1549. (doi: 10.1080/22221751.2019.-1681242)

22 Jamoralin MC Jr, Argimón S, Lagrada ML, Villamin AS, Masim ML, Gayeta JM, Boehme KD, Olorosa AM, Sia SB, Hufano CM, Cohen V, Hernandez LT, Jeffrey B, Abudahab K, Stelling J, Holden MTG, Aanensenb DM; Carlota CC; Philippines Antimicrobial Resistance Surveillance Program. Western Pac Surveill Response J.-2021 Feb 26;12(1):17-25. (doi: 10.5365/wpsar.2020.11.1.005. eCollection 2021 Jan-Mar.PMID: 34094619)

23 Peng J., Russell J., Alexander S. Can proteomics elucidate mechanisms of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* that whole genome sequencing is unable to identify? An analysis of protein expression within the 2016 WHO *N.gonorrhoeae* reference strains. Sex Transm Infect.-2020 Aug;96(5):330-334. (doi: 10.1136/sextrans-2019-054220. Epub 2019 Dec 4)

24 Cehovin A., B Lewis S. Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae*: movement for change. Pathog Dis. 2017 Aug 31;75(6). (doi: 10.1093/femspd/ftx071)

- 25 Town K., Harris S., Sánchez-Busó L., J Cole M., Pitt R., Fifer H., Mohammed H., Field N., Hughes G. Genomic and Phenotypic Variability in *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility, England. *Emerg Infect Dis.* 2020 Mar;26(3):505-515. (doi: 10.3201/eid2603.190732)
- 26 Pinto M., Borges V., Isidro J., Carlos Rodrigues J., Vieira L., Borrego M., Gomes J.P. *Neisseria gonorrhoeae* clustering to reveal major European whole-genome-sequencing-based genogroups in association with antimicrobial resistance. *Microb Genom.*-2021 Feb;7(2):000481.(doi: 10.1099/mgen.0.000481)
- 27 Mortimer T., H. Grad J. Applications of genomics to slow the spread of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann N Y Acad Sci.*-2019 Jan;1435(1):93-109. (doi: 10.1111/nyas.13871. Epub 2018 Jun 6)
- 28 Schaub R., Dillard G. Peptidoglycan Composition in *Neisseria*. *Methods Mol Biol.*-2019; 1997:111-120. (doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_8)
- 29 Gianecini R.A., Poklepovich T., Golparian D., Cuenca N., Tuduri E., Unemo M., Campos J., Galarza P. Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme-Argentina Genomic Epidemiology of Azithromycin-Nonsusceptible *Neisseria gonorrhoeae*, Argentina, 2005-2019. *Emerg Infect Dis.*-2021;27(9):2369-2378. (doi: 10.3201/eid2709.204843)
- 30 Grad YH, Harris SR, Kirkcaldy RD et al. Genomic epidemiology of gonococcal resistance to extended-spectrum cephalosporins, macrolides, and fluoroquinolones in the United States, 2000-2013. *J Infect Dis.*-2016;214:1579-87. (doi.org/10.1093/infdis/jiw420)
- 31 Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.*-2014;27:587-613. (doi: 10.1128/CMR.00010-14)
- 32 Rubin D HF., Ross J. DC., Grad Y.H. The frontiers of addressing antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Transl Res.*-2020 Jun;220:122-137. (doi: 10.1016/j.trsl.2020.02.002. Epub 2020 Feb 29)
- 33 Golparian D., Sánchez-Busó L., Cole M., Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance (NG-STAR) clonal complexes are consistent with genomic phylogeny and provide simple nomenclature, rapid visualization and antimicrobial resistance (AMR) lineage predictions. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Mar 12;76(4):940-944. (doi: 10.1093/jac/dkaa552)
- 34 Lahra M., Martin I., Demczuk W., Jennison A.V., Ken-Ichi Lee, Nakayama S., Lefebvre B., Longtin J., Ward A., Mulvey M.R., Wi T., Ohnishi M., Whiley D. Cooperative Recognition of Internationally Disseminated Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strain. *Emerg Infect Dis.*-2018 Apr;24(4):735-740. (doi: 10.3201/eid2404.171873)
- 35 Jiang F.L., Lan Q., Le WJ., Su XH. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Hefei (2014-2015): genetic characteristics of antimicrobial resistance. *Infect Dis.*-2017 May 25;17(1):366. (doi: 10.1186/s12879-017-2472-z)
- 36 Jabeen K., Pushpa Bhawan Mal, Khan E., Chandio S., Jacobsson S., Unemo M. Antimicrobial resistance and *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) genotypes in *N. gonorrhoeae* during 2012-2014 in Karachi, Pakistan. *Infect Dis.*-2016 Jul 22;16:353. (doi: 10.1186/s12879-016-1673-1)
- 37 Abrams AJ., Trees DL. Genomic sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* to respond to the urgent threat of antimicrobial-resistant gonorrhea. *Pathog Dis.*-2017 Jun 1;75(4):10.1093/femspd.ftx041. (doi: 10.1093/femspd/ftx041)
- 38 Pinto M., Rodrigues JC., Matias R., Água-Doce I., Cordeiro D., Correia C., Gomes JP., Borrego MJ., PTGonoNet Fifteen years of a nationwide culture collection of *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*-2020 Sep;39(9):1761-1770. (doi: 10.1007/s10096-020-03907-7. Epub 2020 Jun 3)
- 39 Whiley DM., Trembizki E., Buckley C., Freeman K., Baird RW., Beaman M., Chen M., Donovan B., Kundu RL., Fairley CK., Guy R., Hogan T., Kaldor JM., Karimi M., Limnios A., Regan DG., Ryder N., Su JY., Ward J., Lahra M. Molecular Antimicrobial Resistance Surveillance for *Neisseria gonorrhoeae*, Northern Territory, Australia. *Emerg Infect Dis.*-2017 Sep;23(9):1478-1485. (doi: 10.3201/eid2309.170427)
- 40 Carannante A, Ciammaruconi A., Vacca P., Anselmo P., Fillo S., Palozzi AM, Fortunato A., Lista F., Stefanelli P. Genomic Characterization of Gonococci from Different Anatomic Sites, Italy, 2007-2014. *Microb Drug Resist.*-2019 Nov;25(9):1316-1324. (doi: 10.1089/mdr.2018.0371. Epub 2019 Jun 20)
- 41 Zhang C., Xiu L., Li Y., Sun L., Li Y., Zeng Y., Wang F, Peng J. Multiplex PCR and Nanopore Sequencing of Genes Associated with Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Directly from Clinical Samples. *Clin Chem.* 2021 Mar 31;67(4):610-620. (doi: 10.1093/clinchem/hvaa306)

42 Bodoev I., Malahova M., Bespyatyh YU., Bespyatyh D., Arapidi G., Pobeguc O., Zgoda V., SHitikov E., Il'ina E. Zameny v SurA i BamA privodyat k snizheniyu chuvstvitel'nosti gonokokkov k antibiotikam shirokogo spektra dejstviya. Geny (Bazel').-2021 sen;12(9):1312. (doi:10.3390/genes-12091312)

43 Schmerer MW., Abrams AJ., Seby S., Thomas 4th JS., Cartee J., Lucking S., Vidyaprakash E., Pham CD., Sharpe S., Pettus K., St Cyr SB., Torrone EA., N Kersh E. Genomic Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* Strains from 2016 U.S. Sentinel Surveillance Displaying Reduced Susceptibility to Azithromycin. Antimicrob Agents Chemother, 2020 Apr 21;64(5):e02420-19. (doi: 10.1128/AAC.02420-19. Print 2020 Apr 21)

44 Wang H., Wang Y., Yong G., Li X., Yu L., Ma S., Luo T. Emergence and genomic characterization of the ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone in Chengdu, China. J Antimicrob Chemother, 2020 Sep 1;75(9):2495-2498. (doi: 10.1093/jac/dkaa123)

45 Harrison O.B., Cehovin A., Skett J., Jolley K A., Massari P., Genco C.A., Tang C.M., Maiden M. *Neisseria gonorrhoeae* Population Genomics: Use of the Gonococcal Core Genome to Improve Surveillance of Antimicrobial Resistance. J Infect Dis.-2020 Nov 9;222(11):1816-1825. (doi: 10.1093/infdis/jiaa002)

46 Peng T., Lin H., Liu Q., Cao W., Ding H., Chen J., Tang L. Ceftriaxone susceptibility and molecular characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Changsha, China. J Infect Chemother, 2017 Jun;23(6):385-389. (doi: 10.1016/j.jiac.2017.-03.007.Epub 2017 Apr 23)

47 Attram N., Agbodzi B., Dela H., Behene E., Nyarko E., Kyei N., Larbi J A., Lawson BWL., Addo K K., Newman M J., Duplessis C A., Adams N., Unemo M., Letizia A J. Antimicrobial resistance (AMR) and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in Ghana, 2012-2015. PLoS One.-2019 Oct 10;14(10):e0223598. (doi: 10.1371/journal.pone.0223598. eCollection 2019)

48 Qin X., Zhao Y., Chen W., Wu W., Tang S., Li G., Yuqi Y., Cao W., Liu X., Huang J., Yang J., Chen W., Tang W., Zheng H. Changing antimicrobial susceptibility and molecular characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Guangdong, China: in a background of rapidly rising epidemic. Int J Antimicrob Agents, 2019 Dec;54(6):757-765. (doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.08.015. Epub 2019 Aug 16.)

49 Kubanov A.A., Leinsoo Ф.Т., A. Chestkov V., Dementieva E. I., Shaskolskiy B. L., Solomka V. S., Gryadunov D.A., Deryabin D.G. Drug resistance mutations and susceptibility phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. Mol Biol(Mosk), 2017 May-Jun; 51(3):431-441. (doi: 10.7868/S0026898417030119)

50 Heath N. L., Rowlands R. S., Webster G., Mahenthiralingam E., Beeton E. Antimicrobial activity of enacyloxin IIa and gladiolin against the urogenital pathogens *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma spp.* J. Appl. Microbiol.-2021 May;130(5):1546-1551. (doi: 10.1111/jam.14858. Epub 2020 Oct 21)

А.Т. АБИШЕВ¹, М.Х. ДЖУСУПГАЛИЕВА^{1*}, М.К. ГАБАСОВА¹,
А.Ж. ЖҰМАБЕКОВА¹, С.С. ЯКУШЕНКО²

¹Казахский научный центр дерматологии и инфекционных заболеваний, Алматы,
Казахстан

²ГУЗ областной кожно-венерологический диспансер, Липецк, Российская Федерация
*e-mail: dzhusupgalieva@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМНОЙ И ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *NEISSERIA GONORRHOEAE* К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Аннотация

По данным отечественных и зарубежных исследователей, гонококковая инфекция в последние годы представляет актуальную проблему во всем мире в связи с возникновением и распространением штаммов, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам. В обзоре представлены результаты исследований по изучению чувствительности циркулирующих штаммов в Казахстане, странах ближнего и дальнего зарубежья.

Ранее проведенное изучение профиля антибиотикорезистентности казахстанской популяции *Neisseria gonorrhoeae* показало, что наименее активным антибиотиком в отношении исследованных

штаммов *Neisseria gonorrhoeae* являлся пенициллин (29,7%), самым активным - цефтриаксон (0,7% - резистентных и 1,3% - умеренно-резистентных штаммов). Анализ генетической гетерогенности казахстанских изолятов *Neisseria gonorrhoeae* показал, что 16S-23S рибосомного межгенного спейсера штаммов *Neisseria gonorrhoeae* обладает низкой внутривидовой вариабельностью.

В большинстве стран мира в настоящее время продолжают исследования, направленные на изучение путей распространения антибиотикорезистентных штаммов гонококков, молекулярных механизмов развития устойчивости, которые позволят в скором будущем определить локализации и характер мутаций, приводящих к развитию резистентности.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, антимикробные препараты, антибиотикочувствительность, полирезистентность, генетическая гетерогенность.

FTAMP: 76.29.57

А.Т. ӘБШЕВ¹, М.Х. ЖҮСПҒАЛИЕВА^{1*}, М.Қ. ҒАБАСОВА¹,
А.Ж. ЖҰМАБЕКОВА¹, С.С. ЯКУШЕНКО²

¹Қазақ дерматология және жұқпалық аурулар ғылыми орталығы, Алматы, Қазақстан

²ҚДСБ облыстық тері-венерологиялық диспансер, Липецк, Ресей Федерациясы

*e-mail: dzhusupgalieva@mail.ru

NEISSERIA GONORRHOEAE-Ң МИКРОБҚА ҚАРСЫ СЕЗІМТАЛДЫҒЫНЫҢ ГЕНОМДЫҚ ЖӘНЕ ФЕНОТИПТІК ӨЗГЕРГІШТІГІНІҢ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.05

Түйін

Отандық және шетелдік зерттеушілердің айтуынша, соңғы жылдары гонококк жұқпасы микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге бірнеше дәріге төзімділікпен сипатталатын штамдардың пайда болуы мен таралуына байланысты бүкіл әлемде өзекті мәселе болып табылады. Бұл әдеби шолуда Қазақстан мемлекетіндегі, жақын және алыс шетелдерде айналымда жүрген штамдардың сезімталдығын тексеру бойынша зерттеулердің нәтижелері ұсынылған.

Қазақстандық *Neisseria gonorrhoeae* популяциясының антибиотикке төзімділік бейініне бұрын жүргізілген зерттеу *Neisseria gonorrhoeae* штамдарына қатысты ең белсенді антибиотик цефтриаксон (0,7% - төзімді және 1,3% - орташа төзімді штамдар), белсенділігі ең төмен антибиотик пенициллин (29,7%) екенін көрсетті. *Neisseria gonorrhoeae*-ның қазақстандық изоляттарының генетикалық әр тектілігін талдау жасағанда *Neisseria gonorrhoeae* штамдарының рибосомалық интергендік спейсерінің 16s-23s төмен түрішілік өзгеріштікке ие екенін көрсетті.

Қазіргі уақытта әлемнің көптеген елдерінде гонококктардың антибиотикке төзімді штамдарының таралу жолдарын, төзімділікті дамытудың молекулалық механизмдерін зерттеуге бағытталған зерттеулер жалғасуда, бұл жақын арада төзімділіктің дамуына әкелетін тұқым қуалайтын өзгеріштіктердің орналасуы мен сипатын анықтауға мүмкіндік береді.

Кілтті сөздер: *Neisseria gonorrhoeae*, микробқа қарсы дәрі-дәрмектер, антибиотикке сезімталдық, көптөзімділік, генетикалық әр тектілік.

Жыл сайын бүкіл әлемде Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ДДҰ) деректері бойынша гонококк жұқпасы ауруының жоғары тіркелуі байқалады [1].

Гонококкты жұқпамен ауыратындар көбінесе бала туу жасындағы жас адамдар болуы ерекше мән беретін өзекті мәселе екенін білдіреді, бұл одан әрі фертильділікке кері әсерін тигізеді. Тағы бір маңызды мәселе, ол соңғы онжылдықтарда үнемі кездесетін *N.gonorrhoeae* штамдарының микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге тұрақтылығының жыл сайын артып келе жатқандығы болып табылады [2].

Жыныстық жолмен берілетін инфекциялар бойынша денсаулық сақтау секторының жаһандық стратегиясы жобасы *N.gonorrhoeae*-ға бағытталған, бұл аурудың емделмейтін түрлерінің өсу қаупіне байланысты шұғыл шараларды қажет етеді [3].

N.gonorrhoeae-ға микробқа қарсы тұрақтылықты ұзақ мерзімді қадағалау Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымында (ДДҰ) Батыс Тынық мұхиты аймағында (WPR) 1992 жылдан бастап гонококк инфекцияларын антибиотиктермен емдеуді оңтайландыру үшін жүргізілуде. Гонококкты микробқа қарсы қадағалау бағдарламасы (GASP) 2007 жылдан бері жұмыс істейді [4], және қазіргі уақытта ДДҰ қолдауымен 5 континенттің 67 елінде жүзеге асырылуда [5]. Ресей Федерациясында бұл бағдарламаның халықаралық қоғамдастық мойындаған отандық нұсқасы RU-GASP (Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme) 2002 жылдан бастап жүзеге асырылуда [6], бастамашысы болып Ресей Федерациясының аумағында Мемлекеттік ғылыми Ресей Денсаулық сақтау министрлігінің Дерматовенерология және косметология орталығы табылады.

Бақылау деректері бойынша *N. gonorrhoeae* антибиотиктерге төзімділігі барлық жерде артып келеді. Қазақстанда *N. gonorrhoeae* штамдарының антибиотиктерге төзімділігін анықтау бойынша зерттеулер жүргізілді, бұл аймақтағы айналымдағы штамдардың сезімталдығының айтарлықтай гетерогенділігімен сипатталатынын көрсетті. *N. gonorrhoeae*-н микробқа қарсы препараттарға сезімталдығының уақыттық өзгерістері анық байқалды.

Эритромицинге (57%), тетрациклинге (60%) және канамицинге (47%) төзімділігі артты, көп дәріге төзімді *N.gonorrhoeae* штамдарының саны (56,1-69%) өсті, бірақ пенициллинге және оның туындыларына сезімталдық сақталды [7]. Осыған байланысты гонококктардың қазіргі жағдайда Қазақстан Республикасында микробқа қарсы препараттарға төзімділігі туралы мәліметтер алу қажет болды. 2009 жылдан 2011 жылға дейін гонококк инфекциясының қоздырғышының негізгі микробқа қарсы препараттарға антибиотиктерге төзімділік профилін және *N.gonorrhoeae* қазақ популяциясының генетикалық гетерогенділігін анықтау бойынша зерттеулер жүргізілді.

Микробқа қарсы препараттарға сезімталдықты зерттеу нәтижесінде *N.gonorrhoeae* штамдарына қатысты ең төмен белсенді препарат пенициллин (төзімді штамдардың пайызы шамамен 30%), одан кейін кему ретімен тетрациклин (шамамен 35% - төзімді, 47% -дан астам - орташа төзімді) және ципрофлоксацин (33% - төзімді және 41% -дан астам - орташа төзімді) екені анықталды. *N. gonorrhoeae*-ға қарсы ең белсенді антибиотик цефтриаксон болды (1%-ға дейін төзімді және 1,2%-дан жоғары орташа төзімді) [8,9]. Қазақстандық *N. gonorrhoeae* изоляттарының генетикалық гетерогенділігіне талдау жүргізілді, ол *N. gonorrhoeae* штамдарының 16S-23S рибосомалық генаралық спейсерінде түр ішілік өзгергіштік төмен екенін көрсетті.

Құрамында ДНҚ бар № 2,5,8,13,16,18,26,36,37 және екінші топ №1, 4,14,15,29,33 және GENE BANK-тан алынған референттік штамдарды қоса алғанда екі үлкен изоляттар тобы бөлінеді. Аталған топтар T->C 1954 ауыстыру мен T 1948 делецияны ажыратады. Нәтижелер кем дегенде төрт қолайлы локусты (*N. gonorrhoeae* геномындағы әлеуетті VNTR локустарын) анықтады және осы локустарды амплификациялауға арналған олигонуклеотидті праймерлер жасалынып шығарылды.

Үлгіні талдау негізінде *N. gonorrhoeae* 98 изоляттарын *porG*- және *ora*-типтеу PIV сероварларына жататын зерттелетін топ штамдарының көпшілігі фторхинолондарға да, пенициллинге және тетрациклинге де төзімді болып шықты, яғни олар мультитөзімді болып шықты.

Хинолондарға төзімділікті анықтайтын *gyrA* және *parA* гендерінің аймақтарында өзгерістердің болуын анықтау үшін ципрофлоксацин препаратына төзімді 98 *N.gonorrhoeae* изоляттарын егжей-тегжейлі талдау және *gyrA* және *parA* гендері үшін күшейту өнімдерінің балку қисықтарын талдау, балку қисықтарын талдау әдісі арқылы *gyrA* геніндегі мутацияларды анықтау үшін, гетеродуплекстердің балкуын талдау үшін неғұрлым

мүқият тәртіптеуді немесе мутациялары бар локусты толықтыратын қосымша олигонуклеотид -сынаманы пайдалануды талап етеді.

рагС геніндегі өзгерістер спектрі. рагС гені үшін ПТР өнімдерінің балку қисықтарын талдау осы гендегі мутацияларды анықтау үшін пайдаланылуы мүмкін. gyrA және рагС гендерінің мутациялары бар үлгілерді бұрын алынған дендрограммалармен салыстыру мутациялары бар үлгілердің дендрограммалардың ешқайсысында бөлек кластерлерді құрамайтынын көрсетті, бұл бұл мутациялардың жақында пайда болғанын білдіреді [10-13].

2004 жылдан бастап Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының стандарттарына сәйкес Ресей Федерациясында 2015 жылдың ағымдағы жағдайын ұсынатын Гонококкты микробқа қарсы ұлттық қадағалау бағдарламасы (RU-GASP) жұмыс істейді. Оған *N.gonorrhoeae* антибиотикке сезімталдық, бастапқы генетикалық төзімділіктің детерминанттары және штаммға спецификалық реттілік түрлері арасындағы байланыстар кірді.

Жалпы алғанда 2015 жылы Ресейдің 9 аймағынан алынған барлығы *N. gonorrhoeae*-ң 124 штаммын *N. gonorrhoeae*-ны мультиантигенді типтеуді (NG-MAST) - микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге сезімталдығын анықтау жөніндегі Еуропалық комитетке (EUCAST) сәйкес микробқа қарсы сезімталдықты анықтау сынағы, пенициллин G-ға, тетрациклинге және фторхинолондарға төзімділікке жауапты *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA* және *рагС* гендеріндегі тұқым қуалайтын өзгергіштіктерді анықтаудың олигонуклеотидтік микрочипі және критерийлерін қолдану арқылы зерттеді. (G) генотобының изоляттары олардың реттілік түрлері (ST) *porB* және *ibpB* негізінде бағаланды.

Ресейде NG-MAST-пен талдағанда, *N.gonorrhoeae*-ның 58 реттік түрі бар, олардың 35-і алғаш рет сипатталған, диверсифицирленген популяциясын көрсетті. Ресей Федерациясының кейбір аймақтарына және бұрынғы КСРО-ның бірқатар елдеріне тән 807, 1544, 1993, 5714, 9476 және 12531 СЦ-ы бес немесе одан да көп изоляттарымен ұсынылған болатын. Бүкіл әлемде кең таралған ST 1407 штаммы осы аталмыш зерттеуде бір ақ штамммен ұсынылған. Гендік топтарға бөлу *N. gonorrhoeae* реттілік түрін, микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге тұрақтылық спектрлері және генетикалық төзімділік детерминанттарының мазмұны арасындағы байланыстарды зерттеуді жеңілдетті. Алдын ала сезімтал (G-807, G-12531) және төзімді (G-5714, G-9476) гендік топтар анықталған.

Бұл нәтижелер авторларға *N.gonorrhoeae*-ның популяциясында пенициллин G (60,5%), ципрофлоксацин (41,1%) және тетрациклин (25%) сияқты бұрын ұсынылған микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге төзімділік немесе аралық сезімталдық жиі кездеседі деген қорытындыға келуге мүмкіндік берді. Алдыңғы хабарламалар және ағымдағы деректерге сүйене отырып, цефтриаксон мен спектиномицинді Ресейде гонореяға қарсы бірінші қатардағы эмпирикалық микробқа қарсы жеке емдеу ретінде ұсыну керек [14].

2016 жылы Санкт-Петербург қаласының Орталық ауданында *N.gonorrhoeae* штамдарының аймақтық сезімталдығын зерттеу бойынша зерттеулер жүргізілді, олар гонококктардың пенициллинге, тетрациклинге және ципрофлоксацинге төзімділігінің жоғары деңгейін көрсетті (тиісінше 75,0; 62,5 және 50,0 % төзімді штаммдарға сәйкес), қоздырғыштың цефтриаксонға, цефиксимге, спектиномицинге және азитромицинге сезімталдығын сақтай отырып (тиісінше 0; 0; 6,3; 6,3 төзімді штаммдар); цефтриаксонға, цефиксимге, спектиномицинге және азитромицинге (тиісінше 0; 0; 6,3; 6,3 төзімді штаммдар). Зерттеулер Ресей Федерациясының әрбір өңірінде гонококк жұқпасы қоздырғышының антибиотикке төзімділігіне тұрақты мониторинг жүргізу қажеттілігін растайды [15].

2015-2016 жылдары бөлінген 365 *N.gonorrhoeae* штамдарының сезімталдығына Ресей Федерациясының 8 өңірінде, Татарстан Республикасында және Чуваш Республикасында зерттеу жүргізілді, оның ол зерттеулердің нәтижесінде зерттелген изоляттардың цефтриаксонға (100%) және спектиномицинге (98,9%) жоғары сезімталдығы және РФ-ның жекелеген өңірлерінде - бензилпенициллинге, тетрациклинге,

ципрофлоксацинге және азитромицинге сезімталдықтың айтарлықтай өзгеріске ұшырауы анықталды.

Осыған орай, зерттеу нәтижелері Ресей Федерациясының аумағында айналымда жүрген *N. gonorrhoeae* штамдарының айқын әр тектілігін анықтауға мүмкіндік берді. Алынған деректер гонококк жұқпасын емдеуде қолданылатын микробқа қарсы препараттардың федералдық тізіміне толықтырулар ретінде пайдалануға мүмкіндік береді.

Жоғарыда аталған штамдардың молекулалық типтері *N.gonorrhoeae*-ң қазіргі заманғы ресейлік популяцияның айтарлықтай әртүрлілігін көрсетті. Көптеген аймақтарда анықталған және ең саны көп штамдар барлық тексерілген микробқа қарсы препараттарға сезімталдығымен сипатталды. Дәрі-дәрмекке мультитөзімді сиквенс типтер олардан саны жағынан төмен болды және Ресей Федерациясының белгілі бір субъектісімен байланысты болды [16].

Басқа зерттеуші ғалымдар Ресей Федерациясының *N. gonorrhoeae* қазіргі популяциясының тетрациклинге төзімділік деңгейін бағалады, мұнда бұл препарат 2003 жылы гонококк жұқпасын емдеу режимінен алынып тасталған.

Барлығы 2015 жылдан 2017 жылға дейінгі кезеңде тетрациклинге төзімділікке қатысатын генетикалық маркерлердің болуына (*porB*, *gpsJ* және *mtrR* гендерінің хромосомалық тұқым қуалайтын өзгергіштіктері және плазмидада орналасқан *tetM* гені) талдау жасалды. *N.gonorrhoeae* бір изолятында 1239-1240 позициясында AG делециясы бар ақаулы *tetM* гені табылды, жаңа тоқтату кодоны енгізілді, бұл TetM протеинінің синтезінің бұзылуына және тетрациклинге төзімділіктің төмендеуіне әкелді. *N.gonorrhoeae* NG-MAST және *tetM* локустарын пайдалану арқылы салынған филогенетикалық ағаштар салыстырылды. *N. gonorrhoeae* тізбегі түрі мен *tetM* плазмидті түрі арасында күрделі байланыс байқалды. Он жыл бұрын анықталған төзімділігі бар изоляттардың үлесіне (75%) қатысты *N.gonorrhoeae*-ң тетрациклинге сезімталдығының ішінара қалпына келгені байқалды [17].

Қырғызстанда гонореяны емдеу бойынша Қырғыздың Ұлттық нұсқаулығын жаңарту мақсатында алғаш рет микробқа қарсы препараттарға төзімділік (МПТ) және 2012 (n =84) және 2017 (n =72) жылдары өсірілген *N.gonorrhoeae* изоляттарының молекулалық эпидемиологиясы зерттелді. *N.gonorrhoeae* мультиантигенінің (NG-MAST) тізбектілігін типтеу жүргізілді.

Гонококктың изоляттары 69 сиквенс түрлеріне жатқызылды, олардың 52-сі (75,4%) жаңа болды. Қырғызстанда 2012 және 2017 жылдары өсірілген гонококктардың популяцияларының жоғары генетикалық гетерогенділігін көрсетті. Цефтриаксон 500-1000 мг 2 г азитромицинмен немесе доксициклинмен біріктірілімде, әсіресе хламидиозды жұқпа жоққа шығарылмаған жағдайда бірінші қатардағы эмпирикалық ем ретінде ұсынылады. Спектиномицин 2 г баламалы ем бола алады және жұтқыншақтың гонореясы жоққа шығарылмаған жағдайда 2 г азитромицинмен бірге тағайындалуы мүмкін. Қырғызстанда гонореяны эмпирикалық емдеу мақсатында фторхинолондарды, аминогликозидтерді, бензилпенициллинді немесе тетрациклиндерді қолдану ұсынылмайды. Авторлар сапасы кепілдендірілген МПТ деректеріне негізделген гонореяны емдеуге арналған Ұлттық нұсқауларды жаңартып, қатаң сақтау маңызды деген қорытындыға келді. Қырғызстанда гонококктық микробқа қарсы препараттарға төзімділікке кеңейтілген және жақсартылған эпидемиологиялық қадағалау жүргізудің шешуші маңызы бар [18].

2010-2013 жылдары Беларусь елінде гонококктардың микробқа қарсы препараттарға төзімділігінің таралуы мен динамикасы, сондай-ақ *N.gonorrhoeae* штамдарының молекулалық-эпидемиологиялық сипаттамалары зерттелді.

Бұл эпидемиологиялық қадағалаудың нәтижелері гонококкты микробқа қарсы препараттарға төзімділігіне эпидемиологиялық бақылауды одан әрі күшейту және емнің тиімсіздігі мен Беларусьтегі молекулалық-эпидемиологиялық генотиптерді зерттеу үшін Беларусьтегі Ұлттық емдеу нұсқаулығында гонореяға қарсы эмпирикалық емдеудің бірінші

қатарындағы препарат ретінде пенициллин G-ді цефтриаксонмен (1 г бір рет бұлшықет ішіне) алмастыру үшін пайдаланылады [19].

2017-2018 жылдары Қытайда цефтриаксонға және азитромицинге біріктірілген төзімділігі бар көп дәріге төзімді *N. gonorrhoeae*-ның изоляттарын анықтау бойынша зерттеулер жүргізілді, бұл жоғарыда аталған дәрі-дәрмектерге дәрілік төзімділігі бірнешеу болатын сирек штаммды (GC250) және цефтриаксонға төзімділігі және азитромицинге сезімталдығы төмендеген төрт штаммды (GC185, GC195, GC196 және GC249) анықтауға мүмкіндік берді. Барлық штаммдар, соның ішінде цефтриаксонға төзімділікпен тығыз байланысты мозаикалық penA- 60.001штаммы NG-STAR ST1143-ға тиесілі. АМПТ детерминанттарының сипаттамасы және филогенетикалық талдау бұл бес штамм бүкіл әлемде таралып жатқан цефтриаксонға төзімді *N. gonorrhoeae*-мен тығыз байланысты екенін көрсетті. FC428, бірақ азитромицин үшін жоғары МИК (Минималды ингибирлеуші концентрация). Алынған нәтижелер көрсеткендей, бұл клон Қытайда клондық экспансияны бастап қана қоймай, сонымен қатар азитромицинге төзімділікке де ие болды [20].

Гонореямен сырқаттанушылық жоғары мөлшерде тіркелген Батыс Тынық мұхиты аймағында *N.gonorrhoeae*-ң АМПТ штамдары халықтың денсаулығына үлкен қауіп төндіреді, осылайша осы саладағы зерттеушілерді ерекше алаңдатады [21]. Филиппинде бұл патогеннің геномдық эпидемиологиялық зерттеулері болмағандықтан, Филиппинде, МПТ (ARSP), бөлініп алынған клиникалық *N.gonorrhoeae* штаммдарын бақылау және геномдық қадағалау бағдарламасын әзірлеу туралы шешім қабылданды. Бұл бағдарлама 1996 жылдан бері төзімді гонорея туралы ақпаратты жинап келеді.

Jamoralin MC Jr. және басқалары [22] 2013–2014 жылдары ARSP жинаған *N. gonorrhoeae*-ң 21 изолятының толық геномдары секвенирледі. Мультилокусты реттілік түрі, көп антигенді реттілік түрі, микробқа қарсы препараттарға төзімділіктің детерминанттарының болуы және изоляттар арасындағы байланыс реттілік деректерінен алынды. Сондай-ақ фенотиптік және генотиптік төзімділік арасындағы сәйкестік анықталды. Негізінен *bla* TEM генінің, сәйкесінше *gyrA* және *tetM* геніндегі S91F тұқым қуалайтын өзгергіштігінің болуына байланысты 21 изоляттың 10-ы пенициллинге, ципрофлоксацинге және тетрациклинге төзімді болды. Изоляттардың ешқайсысы цефтриаксонға немесе цефиксимге төзімді болмады. Фенотиптік және генотиптік төзімділік арасындағы конкорданттылық төрт кластағы бес антибиотик үшін жалпы 92,38 % құрады. Жаһандық геномдармен салыстыру Филиппиндік геномдарды жаһандық А тізбегіне орналастырды және халықаралық таралу жолын анықтауға әкелді. Бұл *N.gonorrhoeae*-ы алғашқы геномдық зерттеу. ARSP жинаған изоляттар проспективті эпидемиологиялық қадағалауды контекстке келтіру үшін пайдаланылады. Ол бүкіл әлем бойынша дәріге төзімді гонореяның таралуын түсіну үшін Тынық мұхитының Батыс бөлігінде және басқа эндемиялық аймақтардағы геномдық қадағалаудың маңыздылығын көрсетеді [22].

Jianhe Peng және басқалары [23] *N. gonorrhoeae* изоляттарының толық жабық геномдық реттілігі және жақсы анықталған фенотиптік және генотиптік микробқа рақсы препараттардың төзімділік үлгілері бар ДДҰ панелін зерттеу үшін *N. gonorrhoeae*-дағы АМПТ-ті жақсы түсіну үшін сандық, масштабталатын протеомика әдісін әзірледі. *N.gonorrhoeae* эталондық штаммдарынан стандартталған қайталанатын протеин экспрессиясының профильдері алынды. Геномикамен сипатталған штаммдардың ұқсастықтары болды, бірақ әртүрлі протеомдық профильдерді көрсетті. Тотығу стрессі, токсин/антитоксин жүйелері сияқты ағып кету сорғыларынан стресс жауаптарына дейінгі кейбір ақуыздар АМПТ штаммдарында өзгеретіні анықталды. *ltgE* пенициллинге хромосомалық-жанама төзімділікті көрсететін штаммдарда жоғарылады. МасВ (МасА-В макролидті ағынды су сорғысының АТФ гидролизінің бөлігі) ДДҰ-да V (азитромицин MIC > 256 мг/л) екі есе дерлік артты және, азитромицинге төзімділікпен байланысты болуы мүмкін.

Авторлар *N.gonorrhoeae* белоктарының экспрессиясын зерттеудің сенімді әдісін әзірледі. Протеом профильдері генетикалық ұқсас дақтарды ажырата алады. Бұл зерттеу АМПТ-пен байланысты болуы мүмкін *N. gonorrhoeae*-ң күрделі механизмдерін анықтады.

N. gonorrhoeae бірнеше жылжымалы генетикалық элементтерге (ЖГЭ) ие. ЖГЭ *N.gonorrhoeae*-де АМПТ патогенезінде және таралуында рөл атқаруы мүмкін [24]. Филогенетикалық талдау бірдей фенотиптері бар изоляттардың генетикалық байланысы туралы екіұштылыққа рұқсат етеді және АМПТ жаңа тұқым қуалайтын өзгергіштіктер мен клондық экспансиядан немесе сырттан енгізу арқылы оқшауланған интродукциялардан туындағаны туралы ақпарат береді.

Katy Town және басқалары [25] Англиядағы *N.gonorrhoeae* геномдық өзгергіштігін зерттеу үшін 2013-2016 жылдар ішінде жиналған тиісті эпидемиологиялық және микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге сезімталдық деректері бар 1277 изоляттың ретін жасады. АМПТ үшін генетикалық маркерлер мен фенотиптерді салыстыра отырып, авторлар әртүрлі микробқа қарсы сезімталдық профильдері бар 2 *N.gonorrhoeae* линиясын және цефтриаксон үшін МИК-ы жоғарылаған 3 кластерді, *penA* аллельіндегі әртүрлі тұқым қуалайтын өзгергіштіктерді және әртүрлі эпидемиологиялық сипаттамаларды анықтады. Бұл нәтижелер микробқа қарсы сезімталдығы төмендеген *N. gonorrhoeae* Англияда жаңа тұқым қуалайтын өзгергіштік немесе рекомбинация оқиғалары, сондай-ақ сырттан әкелу арқылы әртүрлі репродуктивті желілерде тәуелсіз және бірнеше рет пайда болғанын көрсетеді. *N. gonorrhoeae* АМПТ мониторингілеу және бақылау тек нақты қауіп топтарына немесе орындарға ғана емес, барлық зардап шеккен популяцияларды қамтуы керек.

Miguel Pinto және басқалары [26] жүргізген зерттеудің мақсаты, проспективті зертханалық бақылауды жақсарту үшін WGS деректеріне негізделген геногруппаларға бөлінген *N. gonorrhoeae*-ны кластерлеу болып табылады. Атап айтқанда, ол Еуропадағы негізгі айналымдағы WGS геногруппаларын анықтауға және олар мен АМПТ арасындағы қарым-қатынасты орнатуға бағытталған.

Сайып келгенде, ол 15 жылдық бақылауды қамтитын португал изоляттары бойынша WGS деректерін қосу арқылы жалпыға қолжетімді дерекқорларды байытады. Бүкіл Еуропа бойынша жиналған изоляттардың толық зерттелген 3791 *N. gonorrhoeae*-ң геномы «әр ген сайын» әдісі (яғни, *cgMLST* көмегімен) арқылы талданды.

Кластердің құрамы мен тұрақтылығын талдау изоляттарды кластердің тұрақтылығын көрсететін аллельдік қашықтықтың екі табалдырығымен анықталатын екі сатылы иерархиялық деңгейі бойынша геногруппа бойынша жіктеуге мүмкіндік берді.

N. gonorrhoeae гендік топтарын кластерлеу типтеу әдістеріне кең сәйкес келеді (яғни, *MLST* (мультилокусты реттілікпен типтеу), *NG-MAST* (*N.gonorrhoeae* мультиантигендік реттілік тізбегін типтеу) және *PubMLST* (негізгі геномдық топтары) және Еуропада айналымда жүрген басым геногруппаларды бөліп көрсетеді және, геногруппалардың басым көпшілігі басым АМПТ профилін көрсететінін көрсетті.

Сонымен қатар, потенциалды эпидемиологиялық байланыс үшін анағұрлым кемсітушілік шегімен біріктірілген статикалық емес «әр ген сайын» әдісі авторларға деректерді алдыңғы эпидемия туралы есептермен немесе берілу тізбектерімен салыстыруға мүмкіндік берді.

N.gonorrhoeae-ң генетикалық әртүрлілігін жан-жақты талдауға және Еуропада айналымда жүрген WGS негізіндегі гендік топтарды анықтауға мүмкіндік береді, сонымен бірге олардың жиілігін, географиялық таралуын және нақты АМПТ қолтаңбаларымен потенциалды байланысын бағалауды (және үздіксіз бақылауды) жеңілдетеді.

Бұл стратегия бақыланатын гендік топтарға басымдық беру, пайда болатын төзімді тасымалдаушыларды анықтау және деректерді ортақ пайдалану мен байланыстыруды жеңілдету арқылы денсаулық сақтау ісіне пайдасын тигізуі мүмкін [26].

Tatum D Mortimer және басқалары [27] *N.gonorrhoeae*-ның антибиотиктердің көптеген кластарына төзімділігінің артуын және қазіргі уақытта ұсынылатын емдеу әдістеріне сезімталдығы төмендеген желілердің бүкіл әлемде пайда болуын атап өтеді. Авторлар

N.gonorrhoeae-ң төзімділігін түсіну үшін жасаған WGS-ң үлесін талқылады. Геномика *N.gonorrhoeae*-ң эволюциялық шығу тегі мен популяциялық құрылымына жарық түсірді, сондай-ақ *Neisseria* гендерінің түрлерінің ішінде және өзінара горизонталды көшіру ауқымын көрсетті. WGS сондай-ақ бұрын қолданылған типтеу әдістеріне қарағанда *N.gonorrhoeae*-ның жеке адамдар мен популяциялар арасында берілуіне егжей-тегжейлі эпидемиологиялық талдау жасауға мүмкіндік берді.

N.gonorrhoeae геномикасы бойынша күнделікті жүргізіліп жатқан зерттеулер патогеннің биологиясы мен эволюциясын түсінуге, клиникадағы диагноз қою мен емдеуді жақсартуға және антибиотиктерге төзімділіктің әсерін шектеу үшін қоғамдық денсаулық сақтауды ақпараттандыруға арналған басқа зертханалық әдістерді толықтырады.

Neisseria -ның пептидогликандық құрамы қырық жылдан астам уақыт бойы ғылыми қызығушылық тудырды. Бастапқы зерттеулер пенициллинге сезімтал және төзімді штамдар арасындағы пептидогликандық құрамдағы айырмашылықтарды анықтау арқылы *N.gonorrhoeae* антибиотиктерге төзімділігінің артуы артындағы механизмдерді анықтауға бағытталған. Цитоуытты пептидогликан фрагменттері де *Neisseria* арқылы бөлінетінін ашу пептидогликанның құрамына қызығушылықты арттырды. Бұл әдіс жоғары тиімді сұйықты хроматография (ЖТСХ) көмегімен пептидогликан фрагменттерін тазартуды, ферментативті қорытуды және бөлуді сипаттайды. Онда сондай-ақ сынамаларды масс-спектрометрия арқылы дәл анықтауға болатындай етіп дайындау сипатталады [28].

N.gonorrhoeae азитромицинге сезімтал емес штамдары қоғамдық денсаулық сақтауға жаңа жаһандық қауіп төндіреді. 2015-2018 жылдар аралығында Аргентинада азитромицинге сезімтал емес гонококк жұқпаларының таралуы айтарлықтай өсті. Осы штамдардың геномдық эпидемиологиясын және төзімділік механизмдерін зерттеу үшін Ricardo Ariel Gianesini және басқалары [29] 2005-2019 жылдары Аргентинада жиналған 96 сезімтал емес изоляттардың секвенирлеу нәтижелерін зерттеді. Филогеномикалық талдау географиялық таралуы шектелген және 2015 жылдың қаңтары мен 2019 жылдың қарашасы аралығында айналымда болатын 2 негізгі топты анықтады. Бұл топтарға халықаралық таралған мультилокусты реттілік түрлері (ST) 1580 және 9363 кіреді. МІК 2-4 мкг/мл болатын ST1580 изоляттарында 23S рРНҚ-да тұқым қуалайтын өзгергіштік болды. 2-4 немесе >256 мкг/мл МІК бар ST9363 изоляттарында 23S зРНҚ, *mtr* мозаикалық локуста немесе екеуінде де тұқым қуалайтын өзгергіштік болды. Осы басым клондардың географиялық таралуын және сипаттамаларын анықтау Аргентинада азитромицинге сезімтал емес *N.gonorrhoeae*-ң таралуымен күресу үшін қоғамдық денсаулық сақтаудың саясатын нақтылайды. Жоғарыда айтылғандай, Grad ҮН және басқалары [30] жақында зерттелген изоляттардың 36%-да азитромицинге төзімділікпен байланысты механизмдерді қазіргі білім негізінде анықтау мүмкін емес екенін анықтады. Сонымен қатар, зерттеушілер пенициллинге және басқа микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге төзімділіктің жоғарылауымен байланысты «фактор Х» деп аталатын төзімділіктің өзгермейтін детерминанты бар екенін бұрыннан болжап келеді, бірақ бұл механизм анықталмады [31].

N.gonorrhoeae-мен сырқаттанушылық жиілігі кең ауқымды дәрі-дәрмектерге, соның ішінде бірінші қатардағы дәрі-дәрмектерге антибиотиктерге төзімділік деңгейінің жоғарылауымен бірге тез өсуде. Төзімділіктің артуы емделмейтін гонорея бүкіл әлемде ауыр ауруды тудырады деген қорқынышқа әкелді. Daniel H F Rubin және басқалары [32] төзімділіктің таралуын баяулату және бақылау үшін қабылданатын бірнеше тәсілдерді сипаттады.

Біріншіден, *N.gonorrhoeae*-ға қарсы белсенді әрекет ететін бірқатар ескі препараттар өзгертілді және жаңа дәрі-дәрмектер жасалуда. Екіншіден, көптен бергі маңызды мақсат – вакцина жасау алға жылжуда. Үшіншіден, жаңа диагностикалық әдістер антибиотиктерге төзімділікті жылдам анықтауға және эмпирикалық емдеуден жеке емдеуге көшуге уәде береді. Антибиотиктерге төзімділікпен күресу үшін осы жаңа құралдарды шығару емдеу режимдерінің ұзақтығын арттыру кезінде барлық пациенттерге оңтайлы күтімді камтамасыз ету үшін мұқият қарауды талап етеді.

Daniel Golparian және басқалары [33] молекулалық типтеу арқылы расталған *N. gonorrhoeae*-да АМПТ бақылау қажеттілігін қарастырды, ең дұрысы геномды секвенирлеу арқылы растау. Авторлар *N. gonorrhoeae* АМПТ-ті анықтау үшін клондық кешендерді (NG-STAR) анықтады және олардың гонококктық АМПТ-ы эпидқадағалау үшін пайдалылығын растады. Жалпы дерекқорда бар барлық NG-STAR және ST аллельдері PHYLOViZ 2.0 көмегімен ≥ 5 бірдей аллельдері бар ең жақын аналық ST және ең көп сілтемелері бар аналық ST сәйкес CC анықтау үшін талданды. Тексеру үшін 2013 жылы жарияланған гонококктар бойынша еуропалық деректер жинағы (n=1054), 2016 жылғы ДДҰ анықтамалық штамм тақтасы (n=14) және *N.gonorrhoeae* бірнеше елдерден цефтриаксонға төзімділік детерминанты penA-60.001 (n=7) бар изоляттар қолданылды.

Авторлар CC NG-STAR гонококк геномының филогенезіне сәйкес келеді деген қорытындыға келді; шектеулі есептеу талаптарымен жылдам визуалдауға мүмкіндік береді; қарапайым, қайта жаңғыртылатын және портативті номенклатураны қамтамасыз ету (WGS деректері және кәдімгі Сэнгер секвенирлеу әдісі үшін); және AMR сызықтарын болжау. WGS-пен толықтырылған фенотиптік МҚТ-ны (УПП - Устойчивость к противомикробным препаратам) қадағалау міндетті болып табылады және CC NG-STAR оны тиімді қолдай алады [33].

Цефтриаксон көп жағдайда *N. gonorrhoeae* жұқтырған науқастар үшін бірінші қатардағы емдеу (емшара) болып қала береді.

Monica M. Lahra және тағы басқалары [34] жақында Данияда (GK124) және Канадада (47707) ұқсас штаммдар оқшауланғаннан кейін Жапонияда цефтриаксонға төзімді FC428 *N.gonorrhoeae* клонының ықтимал таралуы туралы зерттеу жүргізді. Авторлар Азиядан саяхаттайтын гетеросексуалды ер адамдарда Австралияда FC428 клонының 2 жағдайы болғаны туралы хабарлайды. Зерттеушілердің биоинформатикалық талдаулары бір нуклеотидті вариациялардың негізгі филогенезін және *in silico* молекулалық типтендіруін қамтиды; филогенетикалық талдау барлық 5 изоляттың арасындағы жақын генетикалық туыстықты көрсетті. Нәтижелер цефтриаксонға төзімді *N. gonorrhoeae* халықаралық берілуінің қосымша дәлелдерін береді. Авторлар осы дәріге төзімді штаммның халықаралық таралуы туралы хабардарлықты арттыруды, емдеу сәтсіздіктері мен байланыстарды анықтауды қоса алғанда, қадағалауды күшейтуді, сондай-ақ халықаралық деректермен алмасуды кеңейтуді ұсынады.

Fa-Xing Jiang және басқалары [35] МҚТ және Хэфей (Қытай) *N. gonorrhoeae* изоляттарына төзімділіктің және генетикалық детерминанттарына сипаттама берген, бұл Қытайдағы гонококқа төзімділіктің молекулалық эпидемиологиясы туралы мол ақпарат береді. Хэфейдегі аурухана клиникасынан 126 *N. gonorrhoeae* изоляттары 2014 жылдың қаңтары мен 2015 жылдың қарашасы аралығында жиналды. Изоляттар penA және mtrR және 23S рРНҚ гендеріндегі тұқым қуалайтын өзгергіштікке сыналды және *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) тізбегін мультиантигендік типтеу арқылы генотиптелді.

Осылайша, 2014–2015 жылдардағы Хэфейдегі *N. gonorrhoeae* изоляттары гонореяны емдеу үшін бұрын ұсынылған АМПТ-ң, мысалы пенициллинге, тетрациклин және ципрофлоксацинге жоғары деңгейін көрсетті, Азитромицинге төзімділіктің таралуы да жоғары болды (28,6%). Спектиномицинге, цефтриаксонға немесе цефиксимге толығымен төзімді изоляттар анықталған жоқ; дегенмен, жалпы алғанда, изоляттардың 11,1% - Э ESC сезімталдығы төмен екендігі анықталды.

Kauser Jabeen және т.б-мен [36] 2012-2014 жылдар аралығында Карачиде (Пәкістан) гонококкты МҚТ таралуы мен тенденцияларына және жергілікті штаммдардың молекулалық эпидемиологиясына зерттеу жүргізілді. Урогенитальды үлгілерден алынған гонококк изоляттары (N=100) Ага Хан университетінің зертханасына берілді. Микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге сезімталдық Etest көмегімен анықталды, молекулалық эпидемиологиясы *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) мультиантигендік типтендіру арқылы бағаланды. Сапаны бақылау ДДҰ С, F, G, K, L, M, N, O және P және ATCC 49226 *N. gonorrhoeae* анықтамалық штамдарын қолдану арқылы жүзеге асырылды.

Спектиномицинге, цефтриаксонға және цефиксимге сезімталдық 100%, ал азитромицинге сезімталдық 99% құрады.

Авторлар гонококктардың жоғары әртаратандырылған популяциясының Карачидегі (Пәкістан) айналымы туралы, 74 NG-MAST ST (62 жаңа ST) пенициллин G, ципрофлоксацин және тетрациклинге төзімділігі жоғары деген қорытынды жасады. Цефтриаксонға төзімділіктің болмауы байқалды, бұл оны таңдау препараты ретінде ұсынуға мүмкіндік береді. Алайда, цефтриаксонның МТК төмендеуіне және аймақта хабарланған төзімділіктің пайда болуына байланысты цефтриаксонның дозасын бұлшықетке салуды 125 мг-дан 250 мг-ға дейін арттыру ұсынылады. Сонымен қатар, ципрофлоксацинге төзімділіктің жоғары деңгейіне байланысты (86%) ципрофлоксацинді ұсынылған бірінші қатардағы емдеуден алып тастау керек. Пәкістанның басқа зертханалары мен қалаларының қатысуымен гонококкты МҚТ мониторингін барынша кеңейту өте маңызды.

N.gonorrhoeae-дің пенициллиндер, тетрациклиндер, фторхинолондар және цефалоспориндерді қоса алғанда, қол жетімді бірінші қатардағы антибиотиктерге төзімділігінің дамуы жаһандық ауқымда көптеген дәріге төзімді гонореяның таралуына әкелді. Жоғары өнімді WGS жетістіктері гонококкты анықтау, емдеу және басқару мүмкіндіктерін кеңейту үшін қолдануға болатын пайдалы құралдарды ұсынады, бұл сайып келгенде бүкіл әлем бойынша гонореяға қарсы күреске көмектеседі.

А Jeanine Abrams және басқаларымен [37] штаммдарды типтендіру, филогеномдық зерттеулер, молекулалық бақылау және трансмиссиялық зерттеулер үшін WGS *N. gonorrhoeae* қолдану қарастырылды. Олардың пікірінше, жоғары өнімді WGS әзірлеу типтендіру әдістеріне, эпидемиологиялық қадағалауға, генетикалық туыстықты талдауға және берілуін зерттеуге әсер ете отырып, микробтық изоляттар мен қауымдастықтарды сипаттау және талдау қабілетінде төңкеріс жасады. WGS құралдарын МҚТ гонококк изоляттарын зерттеуге қолдану, NG-де МҚТ эволюциясы және жергілікті, ұлттық және жаһандық ауқымда төзімді штаммдардың берілуі туралы түсінікті жақсартты.

N. gonorrhoeae МҚТ таралуын бақылау және қадағалау бойынша жоғары ұлттық талаптарды орындауға өз үлесін қосу мақсатында Португалияның ұлттық денсаулық сақтау институты *N. gonorrhoeae* (PTGonoNet) жинау зертханаларының Ұлттық желісін құруға ықпал етті. Бұл зерттеу 2003 жылдан 2018 жылға дейін байқалған *N. gonorrhoeae* МҚТ негізгі тенденциялары туралы хабарлайды. Осы зерттеуде сипатталған барлық изоляттар 35 түрлі мемлекеттік және жеке зертханаларда бөлінген штаммдарды қамтитын Португалияның ұлттық денсаулық сақтау институтының жыныстық жолмен берілетін жұқпалардың Ұлттық анықтамалық зертханасы қолдайтын *N. gonorrhoeae* изоляттардың шартты-патогенді ағымдағы жинағы болып табылады. Молекулалық түрі NG-MAST көмегімен анықталды. Елде кең таралған 2596 изоляттың МҚТ деректері барлық *N. gonorrhoeae* изоляттарының 87,67% - ы кем дегенде бір микробқа қарсы препаратқа сезімталдығының төмен екендігін көрсетті. Көптеген жылдар бойы пенициллинге, тетрациклинге және ципрофлоксацинге сезімталдық пен төзімділіктің тұрақты төмендеуін байқауға болады. Алайда, цефалоспориндерге сезімталдықтың төмендеуі 2018 жылға дейін байқалмады, ал азитромицинге ол үнемі төмен болды. NG-MAST ең көп таралған гендік топтары G1407, G7445, G225, G2 және G1034 болды [38].

Дэвид David M Whiley және басқаларының [39] пікірінше *N. gonorrhoeae* МҚТ бұл денсаулыққа халықаралық деңгейде мойындалған қауіп болып табылады және МҚТ қадағалауын жақсарту үшін жаңа стратегиялар қажет. Австралияның солтүстік аумағы гонореяны емдеу үшін бірінші қатардағы (линия) 2 түрлі емдеу әдісі қолданылатындығымен ерекшеленеді, ең алдымен географиялық орналасуына байланысты. 8 *N. gonorrhoeae* AMR ПТР талдауын қолдану арқылы, цефтриаксон плюс азитромицин немесе амоксициллин плюс азитромицин бірінші қатардағы емдеу үшін ұсынылған, *N. gonorrhoeae* нуклеин қышқылын күшейту сынағы оң нәтиже берген, аймақтарда жиналған 1629 клиникалық тест сыналды. Қоректік ортаға егудің нәтижелеріне негізделген

күнделікті бақылау деректерімен салыстыру жүргізілді. ПТР деректері цефтриаксонға төзімділіктің жоқтығын және азитромицинге төзімділіктің төмен деңгейін (0,2%), сондай-ақ амоксициллин мен азитромицин аймақтарында пенициллинге төзімділіктің <5% екенін растады. Молекулалық әдістерді қолдану кезінде ципрофлоксацинге және пенициллиназа өндіретін *N. gonorrhoeae* төзімділік көрсеткіштері төмен болды. Авторлар *N. gonorrhoeae* МҚТ-ны анықтаудың молекулалық әдістері, әсіресе қоректік ортаға егуді қадағалау шектеулі болған жағдайда, емдеу ұсыныстары үшін дәлелдер базасын арттыруы мүмкін деген қорытындыға келді.

Anna Carannante және т.б. [40] пайда болатын, төзімділігі жиі, гонококкты клондарды анықтау үшін молекулалық эпидемиология тәсілдерін қолдану пайдалы деп санайды. Бұл зерттеуде Италияда 8 жыл ішінде әртүрлі анатомиялық аймақтардан жиналған 67 *N. gonorrhoeae* изоляттары WGS әдісімен талданды. WGS Illumina NextSeq 500 платформасын пайдаланып орындалды. Филогенетикалық талдау бір нуклеотидті ядро полиморфизміне (SNP) және (күрделі) көп локусты негізгі геном тізбегін типтеуге (cgMLST) негізделген. *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) мультиантиген тізбегін типтеу және MLST және *N. gonorrhoeae* тізбегін МҚТ (NG-STAR)–ға типтеу WGS деректерін пайдалана отырып, *in silico* -да жүргізілді. Төрт дәріден тұратын панельге қатысты микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге сезімталдық, градиенттік диффузия әдісі арқылы бағаланды. Жалпы, гонококктардың кластерленуі NG-MAST, MLST, NG-STAR профильдеріне және микробқа қарсы сезімталдыққа сәйкес келді, бірақ пациенттердің бөліну орны, АИТВ жағдайына және жыныстық бағдарына емес. Филогенетикалық талдау тоғыз жинақты (клад) анықтады: олардың екеуі басым болды және g1407 және G2400 геногруппаларының гонококктарын қамтыды.

N. gonorrhoeae МҚТ профильдерін дәл сипаттау үшін жылдам және жан-жақты әдістер қажет. Chi Zhang және басқалары [41] *N. gonorrhoeae*-де тікелей клиникалық үлгілерден МҚТ-мен байланысты 13 генді бір уақытта секвенирлеу үшін ампликонды мультиплексті секвенирлеуге негізделген әдісті қолданды.

Әдісті әзірлеу және тексеру үшін *N. gonorrhoeae* тоғыз штаммы қолданылды. Әдістің дәлдігін анықтау үшін он бір уретральды жағындылар мен соған сәйкес өсірілген изоляттар жұптап сәйкестендірілді. Әдістің сезімталдығын анықтау үшін әртүрлі сұйықтармен имитациялық үлгілер дайындалды. Алмасу реактивтілігін бағалау үшін *Neisseria*-ның бес гонококкты емес штамдары және *N. gonorrhoeae*-ның 24 теріс клиникалық үлгілері қолданылды. Бұл әдіс оның тиімділігін бағалау үшін 64 клиникалық сынамаға қолданылды.

Авторлар үлгілік әдіс ретінде Сэнгер секвенирлеу әдісін пайдалана отырып, ампликонды секвенирлеу арқылы қалпына келтірілген тізбектер 99,5% - дан астамы негізгі дәлдікке ие болды және AMR сайттары дұрыс анықталды деген қорытындыға келді. Анықтау шегі (LOD) 31 көшірмеден/реакциядан төмен болды. Маңызды қайшы (тоғыспалы (перекрестный) реактивтілік байқалмады. Сонымен қатар, мақсатты гендер 64 клиникалық сынамадан, соның ішінде 9 зәр үлгісінен сәтті алынды, бұл әдісті әртүрлі үлгілерде қолдану мүмкіндігін көрсетті. Клиникалық үлгілер үшін нәтижелерді 7 сағат 40 минуттан 10 сағат 40 минутқа дейінгі уақыт аралығында алуға болады, ал изоляттар үшін өңдеу уақыты шамамен 2 сағатқа қысқа болды.

Бұл әдіс әмбебап және жоғары сезімталдық пен дәлдік тұрғысынан артықшылықтары бар бескультуральный диагностика үшін ыңғайлы.

Иван Бодоев, Майя Малахова және т.б. [42] *N. gonorrhoeae* политөзімді штамдарының пайда болуы мен таралуына қатысты алаңдаушылықтың артуы туралы айтты. Зерттеушілер антибиотиктерге төзімді бактериялық қоздырғыштарды тиімді бақылау үшін жаңа микробқа қарсы дәрі-дәрмектерді әзірлеу және бар антибиотиктерге төзімділік механизмдерін түсіну қажет деп санайды. Бұл зерттеуде авторлар *SurA* периплазмалық шаперонындағы және β -ствола *BamA* құрастыру механизмінің құрамдас бөлігіндегі аминқышқылдарын алмастырудан туындаған *N. gonorrhoeae*-да дәріге күтпеген жерден төзімділіктің пайда болуын анықтады. Пенициллинге, тетрациклинге және азитромицинге

сезімталдығының төмендеуімен бірге тиісті гендердегі тұқым қуалайтын өзгергіштіктері бар i19.05 клиникалық изоляты зерттелді. Ng05 NG05 (*surA mut bamA mut ipenA mut*) мутантты штаммы тасымалдау (трансформация) процедурасында реципиент ретінде n01.08 жалпы сезімтал клиникалық изолятты қолдану арқылы алынды. NG05 және n01.08 штамдарының салыстырмалы протеомдық талдауы басқа шаперондардың, Skp және FkpA, сондай-ақ кейбір тасымалдау ақуыздарының айтарлықтай жоғарылағанын анықтады. Эффлюкс (помпа) сорғысын тежеу эксперименттері сезімталдықтың төмендеуіне эффлюкс сорғысының белсенділігі арқылы қол жеткізілетінін көрсетті. Авторлар *surA* и *bamA* гендеріндегі сипатталған тұқым қуалайтын өзгергіштіктер периплазмалық шаперондардың сапалық және сандық өзгерістерін тудырады, бұл өз кезегінде синтезделген жасуша қабығының ақуыздарының қызметін өзгертеді деп болжайды.

Matthew W. Schmerer және т.б. [43] 2016 жылы АҚШ-та жүргізілген бақылаушы эпид бақылауынан азитромицинге сезімталдықтың төмендеуін көрсеткен, *N. gonorrhoeae* штамдарының геномдық сипаттамасын ұсынды. 2016 жылы азитромицинге сезімталдығы төмендеген *N. gonorrhoeae* изоляттарының үлесі 3,6 % - ға дейін өскені айтылды. 2016 жылы жиналған 334 *N. gonorrhoeae* изоляттарының филогенетикалық талдауы *mtg* мозаикалық локусы бар МТК 2-ден 16 мкг/мл-ге дейінгі изоляттардың біртұтас, географиялық әр түрлі сызығын анықтады, ал МИК \geq 16 мкг /мл /ml изоляттарының көпшілігі сирек пайда болды және 23S рРНҚ тұқым қуалайтын өзгергіштігін алып жүрді. *N. gonorrhoeae* изоляттарын одан әрі молекулалық бақылау төзімділіктің жаңа механизмдерін ашады.

Hongren Wang және басқаларының зерттеулерінің мақсаты [44] 2018 жылы Қытайдың оңтүстік-батысындағы Чэнду қаласында цефтриаксонға төзімділіктің пайда болуында бүкіл әлемде таралған *N. gonorrhoeae* FC428 клонының үлесін тексеру болып табылады.

N. gonorrhoeae изоляттарының алты антибиотикке микробқа қарсы сезімталдығы агарда сұйылту әдісімен анықталды. FC428 клонын анықтау үшін нақты сол уақыттағы ПТР талдауы және WGS қолданылды. Туыстас штамдардың берілуі мен эволюциясын сипаттау үшін UPS филогеномдық және молекулалық талдаулары жүргізілді.

Бұл зерттеу 112 *N. gonorrhoeae* изоляттарының төртеуі цефтриаксонға төзімді FC428 клоны екенін растады. Филогеномдық талдау олардың көптеген интродукциялардан және кейіннен жергілікті берілуден туындағанын көрсетті. Штамдар төзімділік гендерінде тұқым қуалайтын өзгергіштіктердің жинақталуымен және/немесе пенициллин мен тетрациклинге төзімділік гендерін кодтайтын плазмидалардың пайда болуымен сипатталатын одан әрі эволюциядан өтті.

Авторлар Қытайдың оңтүстік-батысында *N. gonorrhoeae* FC428 клонының таралуы туралы мәлімдейді және осы сәтті клонның жергілікті және ұлттық деңгейде одан әрі таралуын бақылау үшін гонококты микробқа қарсы дәрі-дәрмектерге бақылауды күшейтуге күш салуға шақырады.

Гонokokк популяциясы биологиясының динамикасы штаммдарды типтеу әдістерінде рұқсаттың болмауына байланысты нашар анықталған.

Odile B. Harrison және т.б. [45] гонококк популяциясының құрылымын түсінуді жақсарту үшін негізгі геномды пайдалануды бағалауды жүргізді.

Гонokokк геномының ядросы болып табылатын барлығы 1668 локус анықталды. Олар негізгі геном тізбегін типтеудің көп локусты схемасына ұйымдастырылды (*N. gonorrhoeae* cgMLST v1.0). Изоляттар арасындағы 400 аллельдік айырмашылықтың шекті мәнін қолданатын кластерлеу алгоритмі гонококктарды негізгі геномның дискретті және тұрақты топтарына бөлуге мүмкіндік берді, олардың кейбіреулері бірнеше онжылдықтар бойы сақталды. Бұл топтар микробқа қарсы генотиптермен және последовательностей NG-STAR и NG-MAST. MLST-ST және тізбектерінің қабаттаспайтын түрлерімен байланысты болды және геномның негізгі топтары арасында кең таралған.

Қытайдан келген зерттеушілер тобы [46] цефтриаксонға сезімталдықты анықтау және *N. gonorrhoeae* изоляттарының молекулалық сипаттамасы бойынша зерттеу жүргізді.

2015 жылдың сәуірі мен 2016 жылдың маусымы аралығында Қытайдың Чанша қаласында барлығы 128 *N. gonorrhoeae* изоляттары реттілікпен алынды. Құрамына *penA*, *mtrR*, *porB* және *porA* кіретін цефтриаксонға төзімділік детерминанттары ПТР көмегімен күшейтілді және ПТР өнімдері ретке келтірілді. Генотиптеу үшін *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) мультиантиген тізбегін типтеу жүргізілді. Нәтижелер изоляттардың 11% (14/128) цефтриаксонға сезімталдығы немесе төзімділігі төмендегенін көрсетті. Цефтриаксонға сезімталдықты тексеру нәтижелері цефтриаксонды Чаншадағы гонорейяны емдеуге арналған бірінші қатардағы препарат ретінде ұсынуға болатынын көрсетті; дегенмен, ұрр бақылауын уақтылы жүргізу маңызды. A501V/T, P551S и *porB1b* тұқым қуалайтын өзгергіштіктері бар мозаикалық емес *penA* аллельдері цефтриаксонға төзімділікке немесе осы аймақтағы *N. gonorrhoeae* сезімталдығының төмендеуіне ықпал етуі мүмкін, ал осы изоляттардағы гетерогенді ST белгілі бір кіші түрдің клондық таралуын жоққа шығарады. Сезімталдығы немесе төзімділігі төмен 14 изолят айтарлықтай әртүрлілікті көрсететін 9 ST-ге бөлінді.

N. gonorrhoeae микробқа қарсы төзімділікті бақылау жергілікті, ұлттық және халықаралық популяциялар арасында МҚТ штаммдарының пайда болуы мен таралуын бақылау үшін маңызды. Бұл емдеу нұсқаулықтарын әзірлеу немесе нақтылау үшін өте маңызды *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) мультиантигендік типтеу ұлттық және халықаралық деңгейде гонококктардың молекулалық эпидемиологиясын сипаттау үшін пайдалы. Беталактам препараттарына МҚТ детерминанттарын анықтау төзімділіктің дамуын бақылау құралы болып табылады.

Ганада қазіргі уақытта гонококкты МҚТ таралуы туралы мәлімет аз, ал гонококкты изоляттарға сипаттама бұрын болмаған.

Naike Attram және тағы басқалар сипаттаған зерттеуде [47] 2012 жылдан 2015 жылға дейін Гананың бес медициналық мекемесінде жиналған гонококк изоляттары (n=44), МҚТ, NG-MAST тестілеуді пайдалану және *penA* генін секвенирлеу арқылы зерттелді. Тетрациклинге (100%), бензилпеницилинге (90,9%) және ципрофлоксацинге (81,8%) төзімділіктің жоғары көрсеткіштері анықталды. Бір изолятта цефиксимнің жоғары МТК (0,75 мкг/мл) болды. NG-MAST (ST) тізбегінің жиырма сегіз түрі анықталды, олардың он жетісі жаңа болды. Цефиксимнің жоғары МПК изолятында *penA-34* мозаикалық аллелі болды және NG-MAST ST1407-ге тиесілі болды, ол көптеген елдерде цефиксимге төзімділіктің көп бөлігін құрайтын бүкіл әлемде кең таралған көп дәріге төзімді клон. Қорытындылай келе, МҚТ тестілеу, NG-MAST және МҚТ детерминанттарын секвенирлеу тетрациклинге, бензилпеницилинге және ципрофлоксацинге төзімділіктің жоғары көрсеткіштерін, сонымен қатар Ганадағы *N. gonorrhoeae* популяциясының өте әртүрлі екендігін анықтады;

Xiaolin Qin және т.б. зерттеуіне сәйкес [48] Қытайда *N. gonorrhoeae* жұқпасының таралуы 2015 жылдан бастап күрт өсті. *N. gonorrhoeae*-дегі ТМК және молекулалық жұмылдыру осы өсіп келе жатқан таралуды анықтайтын екі маңызды фактор болып табылады. Гуандун провинциясының екі қаласында барлығы 704 изолят жиналды. Негізгі микробқа қарсы дәрі-дәрмектердің МТК анықталды және пенициллиназа өндіретін *N. gonorrhoeae* (PPNG) және тетрациклинге төзімді *N. gonorrhoeae* (TRNG) сипатталды және *N. gonorrhoeae* (NG-MAST) тізбегін мультиантигендік типтеу жүргізілді. Пенициллинге (68,2%), тетрациклинге (85,7%) және ципрофлоксацинге (98,2%) жоғары төзімділік анықталды. Спектиномицин, цефтриаксон және азитромицин тиісінше 100%, 96,4% және 90,7% сезімталдықпен тиімді болып шықты. Пенициллинге төзімділік 78,4% - дан 73,6% - ға дейін және азитромицинге 11,9% - дан 3,7% - ға дейін айтарлықтай төмендеді. PPNG, TRNG және PPNG/TRNG жалпы таралуы сәйкесінше 25,4%, 33,1% және 13,4% құрады. PPNG көрсеткіштері 37,3% - дан 23,9% - ға дейін, TRNG 50,0% - дан 31,3% - ға дейін және PPNG/TRNG 23,5% - дан 11,7% - ға дейін айтарлықтай төмендеді. Алайда, африкалық типтегі PPNG үлесі азиялық типтегі PPNG төмендеуімен салыстырғанда (81,6% - дан 33,3% - ға дейін) айтарлықтай өсті (18,4% - дан 64,1% - ға дейін), ал американдық типтегі TRNG

үлесі голландиялық типтегі TRNG төмендеуімен салыстырғанда (100% - дан 86,3% - ға дейін) айтарлықтай өсті (0% - дан 13,7% - ға дейін). 145 жаңа ST бар 2013, 2014 және 2017 жылдары жиналған 380 изоляттың NG-MAST көмегімен барлығы 271 реттілік түрі (ST) анықталды. Африкалық типтегі PPNG көбейіп, азиялық типті алмастырады және жаңа 3T пайда болды.

Зерттеушілер жаңа генотиптері бар гонококк изоляттары осы аймақта гонорея эпидемиясының өсуіне ықпал етуі мүмкін деген қорытындыға келді.

N. gonorrhoeae микробқа қарсы төзімділік дәрежесінің тұрақты өсуі төзімділік тұқым қуалайтын өзгергіштіктердің таралуын бақылауды қажет етеді.

Ресей Федерациясының зерттеушілері [49] дәріге төзімділік тұқым қуалайтын өзгергіштіктерін, микробқа қарсы сезімталдық сынақтарының нәтижелерін және Ресей Федерациясының 9 аймағында жиналған 128 заманауи *N. gonorrhoeae* изоляттарының молекулалық генотиптерін сипаттайтын деректерді ұсынды. Зерттелген *N. gonorrhoeae* изоляттарының үштен бірінде бактериялық хромосомада дәрілік заттарға төзімділіктің бірнеше тұқым қуалайтын өзгергіштігі болды, бұл тұқым қуалайтын өзгергіштік профильдерінің және онымен байланысты микробқа қарсы сезімталдық үлгілерінің бимодальды таралуына әкелді. Бірнеше төзімділіктің таралуын *N. gonorrhoeae* популяциясының клоналдылығына әкелетін тұқым қуалайтын өзгергіштіктердің тікелей тасымалдануымен түсіндіруге болады.

N L Heath және т.б.-мен [50] поликетидті антибиотиктердің микробқа қарсы белсенділігін Burkholderia энацилоксин ПА және гладиолин *N. gonorrhoeae* және *Ureaplasma spp.* штамдарына қатысты зерттелді. Антибиотиктер көптөзімді *N. gonorrhoeae*, WHO V, WHO және WHOS изоляттарын, сондай-ақ макролидтерге, тетрациклинге және ципрофлоксацинге төзімді уреплазмаларды қоса алғанда, 14 *N. gonorrhoeae* және 10 *Ureaplasma spp.*-ге қарсы сыналды. *N. gonorrhoeae* сезімталдығын сынау агарды сұйылту арқылы жүргізілді, ал *Ureaplasma spp* үшін сұйықтықты микро сұйылту және өсу кинетикасын талдау қолданылды.

Авторлар энацилоксин ПА және гладиолин антибиотиктері *N. gonorrhoeae* және *Ureaplasma* бірқатар сезімтал және антибиотикке төзімді изоляттарына қатысты микробқа қарсы белсенділікке ие деген қорытындыға келді.

Бұл зерттеудің маңыздылығы олар үшін антибиотиктердің шектеулі саны бар патогендерге қарсы қолданылатын микробқа қарсы дәрі-дәрмектердің жаңа класының әлеуетін көрсетеді. Бұл қосылыстарды әзірлеу көптеген дәрілерге төзімді штамдардың пайда болуына байланысты қосымша зерттеуді қажет етеді.

Осылайша, ұсынылған шолу осы мәселенің өзектілігін көрсетеді және жоғарыда айтылғандарға сүйене отырып, *N. gonorrhoeae* штамдарының антибиотикке сезімталдығын зерттеуге, МҚП -ға (АМП) төзімді штамдарды да, сезімталдықтың төмендеуін анықтауға, олардың таралу жолдарын талдауға және МҚП-ға төзімділіктің дамуының молекулалық механизмдерін зерттеуге бағытталған қазіргі уақытта бүкіл әлемде жүргізіліп жатқан зерттеулер туралы қорытынды жасауға болады. Жақында жүргізілген зерттеулер *N. gonorrhoeae* штамдарының АМП-ға төзімділігінің дамуына әкелетін тұқым қуалайтын өзгергіштіктердің орналасуы мен сипатын анықтауға мүмкіндік береді, бұл гонококк жұқпасының антибиотикалық емдеудің тиімділігін арттыруға мүмкіндік береді.

Әдебиеттер:

1 Глобальная стратегия сектора здравоохранения по инфекциям, передаваемым половым путем, 2016–2021 гг. ВОЗ; 2016 [Global health sector strategy on Sexually Transmitted Infections, 2016–2021] (Available at: <https://www.who.int/reproductivehealth/-publications/rtis/ghss-stis/ru/>)

2 Unemo M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving *Neisseria gonorrhoeae* continues to challenge. BMC Infect Dis. 2015; 15:364. (doi: 10.1186/s12879-015-1029-2)

3 WHO. 69th World Health Assembly. Draft global health sector strategies. Sexually transmitted infections, 2016-2021. Report by the Secretariat: A69/33; 16 May 2016. (URL: <https://iris.who.int/handle/10665/250695>)

4 WHO Western Pacific Programme; South East Asian GASP, Tapsall J.W., et al. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific and South East Asian regions, 2007-2008. *Commun Dis Intell Q Rep.* 2010; 34(1):1-7. (URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20521493/>)

5 Глобальная стратегия сектора здравоохранения по инфекциям, передаваемым половым путем (ИППП), на период с 2016 по 2021 гг.: на пути к ликвидации ИППП. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2016 г. (URL: http://www.who.int/reproductivehealth/topics/rtis/gasp_network/en/)

6 Кубанов А.А., Рахматулина М.Р., Соломка В.С., Плахова К.И., Честков А.В., Петрова Н.П., Дерябин Д.Г. Антибиотикорезистентность *Neisseria gonorrhoeae* в Российской Федерации: современные тенденции. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2016; 18(4):282-290. (URL: https://who.int/reproductivehealth/topics/rtis/gasp_network/en)

7 Акышбаева К.С. Роль биологических свойств *N.gonorrhoeae* в патогезисе гонококковой инфекции. Автореф. докт.мед.наук. Алматы, 1993.

8 Баев А.И., Тонконогова Г.М., Жактаева Г.М., Садыков Г.А., Вуйко И.В., Константинова Т.В., Ускенбаева А.С., Айманова А.А. Антибиотикорезистентность при гонорее. *Вопросы дерматологии и венерологии,* 2010, 1-2: 20-22.

9 Жактаева Г.М., Тонконогова Г.М., Садыков Г.А. Изучение профиля антибиотикорезистентности гонореи. *Вопросы дерматологии и венерологии,* 2010, 3-4: 144-145.

10 Баев А.И., Муминов Т.А., Тронева А.В., Филиппенко М.Л. Молекулярно-генетическое типирование изолятов *N.gonorrhoeae*, выделенных на территории Республики Казахстан. *Вопросы дерматологии и венерологии,* 2010, 1-2: 7-11.

11 Баев А.И. Молекулярно-генетическое типирование изолятов *N.gonorrhoeae* выделенных на территории Республики Казахстан. *Вопросы дерматологии и венерологии,* 2010, 3-4: 120-122.

12 Kushnir A.V., Muminov T.A., Baev A.I., Khrapov E.A., and Filipenko M.L. Use of VNTR Typing to Test Genetic Diversity of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates. *Molecular genetics, Microbiology and Virology* Vol. 26 No.1 2011, pp. 27-33. (doi.org/10.3103/S0891416811010058)

13 Kushnir A.V., Baev A.I., Khrapov E.A., and Filipenko M.L. Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakhstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012) 570-576. (doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.026)

14 Кубанов А.А., Воробьев А., Честков А.В., Lejnsoo A., SHaskol'skiy B., Дементьева Е., Соломка И. Плахова К., Грядунов С., Дерябин Д.Г. Молекулярная эпидемиология лекарственно-устойчивых *Neisseria gonorrhoeae* в России (Современное состояние, 2015 г.) *Инфекционные болезни,* 2016, 9 августа; 16:389. (doi: 10.1186/s12879-016-1688-7)

15 Бадиков В.Д., Захарова О.Г., Елисеева Т.А., Красных Н.Г. Микробиологические основы рациональной антимикробной терапии гонококковой инфекции. В научно-практическом журнале «Урологические ведомости». Мат. 3-й науч.-практ. конф. урологов Северо-Западного федерального округа РФ. Санкт-Петербург, 2017, Т.7, 16-17. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/>)

16 Соломка В.С., Кубанов А.А., Плахова К.И., Честков А.В., Петрова Н.П., Дерябин Д.Г. Антибиотикорезистентность *Neisseria gonorrhoeae* в Российской Федерации: региональные особенности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия,* 2017, Т.19. 2:153-159. (URL: <https://cmac-journal.ru/en/publication/2016/4/>)

17 Shaskolskiy B., Dementieva E., Lejnsoo A, Petrova N., Chestkov A., Kubanov A, Dmitry Deryabin D, Gryadunov D. Tetracycline resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Russia, 2015-2017. *Infect Genet Evol,* 2018 Sep; 63:236-242. (doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.003. Epub 2018 Jun 5)

18 Karymbaeva S., Boiko I, Jacobsson S, Mamaeva G., Ibraeva A, Usupova D., Golparian D., Unemo M. Antimicrobial resistance and molecular epidemiological typing of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Kyrgyzstan in Central Asia, 2012 and 2017. *Infect Dis.-2021 Jun 12;* 21(1):559. (doi: 10.1186/s12879-021-06262-w)

19 Lebedzeu F., Golparian D., Titov L., Pankratava N, Glazkova S., Shimanskaya I., Charniakova N., Lukyanau A., Domeika M, Unemo M. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010-2013. *Infect Dis.-2015 Jan 31;* 15:29.(doi: 10.1186/s12879-015-0755-9)

- 20 Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):587-613. (doi:10.1128/CMR.00010-14)
- 21 Yuan Q., Li Y., Xiu L., Zhang C., Fu Y., Jiang CH.¹, Tang L., Peng J. Identification of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined resistance to both ceftriaxone and azithromycin, China, 2017-2018. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1546-1549. (doi: 10.1080/22221751.2019.-1681242)
- 22 Jamoralin MC Jr, Argimón S, Lagrada ML, Villamin AS, Masim ML, Gayeta JM, Boehme KD, Olorosa AM, Sia SB, Hufano CM, Cohen V, Hernandez LT, Jeffrey B, Abudahab K, Stelling J, Holden MTG, Aanensenb DM; Carlota CC; Philippines Antimicrobial Resistance Surveillance Program. *Western Pac Surveill Response J.*-2021 Feb 26;12(1):17-25. (doi: 10.5365/wpsar.2020.11.1.005. eCollection 2021 Jan-Mar.PMID: 34094619)
- 23 Peng J., Russell J., Alexander S. Can proteomics elucidate mechanisms of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* that whole genome sequencing is unable to identify? An analysis of protein expression within the 2016 WHO *N.gonorrhoeae* reference strains. *Sex Transm Infect.* 2020, Aug; 96(5):330-334. (doi: 10.1136/sextrans-2019-054220. Epub 2019 Dec 4)
- 24 Cehovin A., B Lewis S. Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae*: movement for change. *Pathog Dis.* 2017 Aug 31;75(6). (doi: 10.1093/femspd/ftx071)
- 25 Town K., Harris S., Sánchez-Busó L., J Cole M., Pitt R., Fifer H., Mohammed H., Field N., Hughes G. Genomic and Phenotypic Variability in *Neisseria gonorrhoeae* Antimicrobial Susceptibility, England. *Emerg Infect Dis.* 2020 Mar;26(3):505-515. (doi: 10.3201/eid2603.190732)
- 26 Pinto M., Borges V., Isidro J., Carlos Rodrigues J., Vieira L., Borrego M., Gomes J.P. *Neisseria gonorrhoeae* clustering to reveal major European whole-genome-sequencing-based genogroups in association with antimicrobial resistance. *Microb Genom.*-2021 Feb;7(2):000481.(doi: 10.1099/mgen.0.000481)
- 27 Mortimer T., H Grad J. Applications of genomics to slow the spread of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann N Y Acad Sci.*-2019 Jan;1435(1):93-109. (doi: 10.1111/nyas.13871. Epub 2018 Jun 6)
- 28 Schaub R., Dillard G. Peptidoglycan Composition in *Neisseria*. *Methods Mol Biol.*-2019;1997:111-120. (doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_8)
- 29 Gianecini R.A., Poklepovich T., Golparian D., Cuenca N., Tuduri E., Unemo M., Campos J., Galarza P. Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Surveillance Programme-Argentinian Genomic Epidemiology of Azithromycin-Nonsusceptible *Neisseria gonorrhoeae*, Argentina, 2005-2019. *Emerg Infect Dis.*-2021;27(9):2369-2378. (doi: 10.3201/eid2709.204843)
- 30 Grad YH, Harris SR, Kirkcaldy RD et al. Genomic epidemiology of gonococcal resistance to extended-spectrum cephalosporins, macrolides, and fluoroquinolones in the United States, 2000-2013. *J Infect Dis.*-2016;214:1579-87. (doi.org/10.1093/infdis/jiw420)
- 31 Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin Microbiol Rev.*-2014;27:587-613. (doi: 10.1128/CMR.00010-14)
- 32 Rubin D HF., Ross J. DC., Grad Y.H. The frontiers of addressing antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Transl Res.*-2020 Jun;220:122-137. (doi: 10.1016/j.trsl.2020.02.002. Epub 2020 Feb 29)
- 33 Golparian D., Sánchez-Busó L., Cole M., Unemo M. *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance (NG-STAR) clonal complexes are consistent with genomic phylogeny and provide simple nomenclature, rapid visualization and antimicrobial resistance (AMR) lineage predictions. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Mar 12;76(4):940-944. (doi: 10.1093/jac/dkaa552)
- 34 Lahra M., Martin I., Demczuk W., Jennison A.V., Ken-Ichi Lee, Nakayama S., Lefebvre B., Longtin J., Ward A., Mulvey M.R., Wi T., Ohnishi M., Whiley D. Cooperative Recognition of Internationally Disseminated Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strain. *Emerg Infect Dis.*-2018 Apr;24(4):735-740. (doi: 10.3201/eid2404.171873)
- 35 Jiang F.L., Lan Q., Le WJ., Su XH. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Hefei (2014-2015): genetic characteristics of antimicrobial resistance /*Infect Dis.*-2017 May 25;17(1):366. (doi: 10.1186/s12879-017-2472-z)
- 36 Jabeen K., Pushpa Bhawan Mal, Khan E., Chandio S., Jacobsson S., Unemo M. Antimicrobial resistance and *Neisseria gonorrhoeae* multiantigen sequence typing (NG-MAST) genotypes in *N. gonorrhoeae* during 2012-2014 in Karachi, Pakistan. *Infect Dis.*-2016 Jul 22;16:353. (doi: 10.1186/s12879-016-1673-1)

37 Abrams AJ., Trees DL. Genomic sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* to respond to the urgent threat of antimicrobial-resistant gonorrhea. *Pathog Dis.*-2017 Jun 1;75(4):10.1093/femspd.ftx041. (doi: 10.1093/femspd/ftx041)

38 Pinto M., Rodrigues JC., Matias R., Água-Doce I., Cordeiro D., Correia C., Gomes JP., Borrego MJ., PTGonoNet Fifteen years of a nationwide culture collection of *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Portugal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*-2020 Sep;39(9):1761-1770. (doi: 10.1007/s10096-020-03907-7. Epub 2020 Jun 3)

39 Whitley DM., Trembizki E., Buckley C., Freeman K., Baird RW., Beaman M., Chen M., Donovan B., Kundu RL., Fairley CK., Guy R., Hogan T., Kaldor JM., Karimi M., Limmios A., Regan DG., Ryder N., Su JY., Ward J., Lahra M. Molecular Antimicrobial Resistance Surveillance for *Neisseria gonorrhoeae*, Northern Territory, Australia. *Emerg Infect Dis.*-2017 Sep;23(9):1478-1485. (doi: 10.3201/eid2309.170427)

40 Carannante A, Ciammaruconi A., Vacca P., Anselmo P., Fillo S., Palozzi AM, Fortunato A., Lista F., Stefanelli P. Genomic Characterization of Gonococci from Different Anatomic Sites, Italy, 2007-2014. *Microb Drug Resist.*-2019 Nov;25(9):1316-1324. (doi: 10.1089/mdr.2018.0371. Epub 2019 Jun 20)

41 Zhang C., Xiu L., Li Y., Sun L., Li Y., Zeng Y., Wang F, Peng J. Multiplex PCR and Nanopore Sequencing of Genes Associated with Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* Directly from Clinical Samples. *Clin Chem.*-2021 Mar 31;67(4):610-620. (doi: 10.1093/clinchem/hvaa306)

42 Бодоев И., Малахова М., Беспярых Ю., Беспярых Д., Арапиди Г., Побегуц О., Згода В., Шитиков Е., Ильина Е. Замены в SurA и BamA приводят к снижению чувствительности гонококков к антибиотикам широкого спектра действия. *Гены (Базель)*, 2021 сен; 12(9): 1312. (doi:10.3390/genes-12091312)

43 Schmerer MW., Abrams AJ., Seby S., Thomas 4th JS., Cartee J., Lucking S., Vidyaprakash E., Pham CD., Sharpe S., Pettus K., St Cyr SB., Torrone EA., N Kersh E. Genomic Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* Strains from 2016 U.S. Sentinel Surveillance Displaying Reduced Susceptibility to Azithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.*-2020 Apr 21;64(5):e02420-19. (doi: 10.1128/AAC.02420-19. Print 2020 Apr 21)

44 Wang H., Wang Y., Yong G., Li X., Yu L., Ma S., Luo T. Emergence and genomic characterization of the ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* FC428 clone in Chengdu, China. *J Antimicrob Chemother.*-2020 Sep 1;75(9):2495-2498. (doi: 10.1093/jac/dkaa123)

45 Harrison O.B., Cehovin A., Skett J., Jolley K A., Massari P., Genco C.A., Tang C.M., Maiden M. *Neisseria gonorrhoeae* Population Genomics: Use of the Gonococcal Core Genome to Improve Surveillance of Antimicrobial Resistance. *J Infect Dis.*-2020 Nov 9;222(11):1816-1825. (doi: 10.1093/infdis/jiaa002)

46 Peng T., Lin H., Liu Q., Cao W., Ding H., Chen J., Tang L. Ceftriaxone susceptibility and molecular characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Changsha, China. *J Infect Chemother.*-2017 Jun;23(6):385-389. (doi: 10.1016/j.jiac.2017.-03.007.Epub 2017 Apr 23)

47 Attram N., Agbodzi B., Dela H., Behene E., Nyarko E., Kyei N., Larbi J A., Lawson BWL., Addo K K., Newman M J., Duplessis C A., Adams N., Unemo M., Letizia A J. Antimicrobial resistance (AMR) and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in Ghana, 2012-2015. *PLoS One.*-2019 Oct 10;14(10):e0223598. (doi: 10.1371/journal.pone.0223598. eCollection 2019)

48 Qin X., Zhao Y., Chen W., Wu W., Tang S., Li G., Yuqi Y., Cao W., Liu X., Huang J., Yang J., Chen W., Tang W., Zheng H. Changing antimicrobial susceptibility and molecular characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Guangdong, China: in a background of rapidly rising epidemic. *Int J Antimicrob Agents*, 2019 Dec;54(6):757-765. (doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.08.015. Epub 2019 Aug 16)

49 Kubanov A.A., Leinsoo Ф.Т., A. Chestkov V., Dementieva E. I., Shaskolskiy B. L., Solomka V. S., Gryadunov D.A., Deryabin D.G. Drug resistance mutations and susceptibility phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. *Mol Biol (Mosk)*, 2017 May-Jun;51(3):431-441. (doi: 10.7868/S0026898417030119)

50 Heath N. L., Rowlands R. S., Webster G., Mahenthiralingam E., Beeton E. Antimicrobial activity of enacyloxin IIa and gladiolin against the urogenital pathogens *Neisseria gonorrhoeae* and *Ureaplasma spp.* *J. Appl. Microbiol*, 2021 May;130(5):1546-1551. (doi: 10.1111/jam.14858. Epub 2020 Oct 21).

IRSTI: 76.75.75

S.T. URAZAYEVA^{1*}, T. BEGALIN¹, V.S. TOIGOMBAEVA², A.B. URAZAYEVA¹,
A.A. AMANSHIEVA¹, G.Zh. NURMAGANBETOVA¹, Sh.M. NURMUKHAMEDOVA¹,
N.E. YERBOLAT¹, D.A. AIDYNGALIYEVA¹

¹West Kazakhstan Marat Ospanov Medical University, Aktobe, Kazakhstan

²Isa Konoevich Akhunbaev Kyrgyz state medical academy, Bishkek, Kyrgyzstan

*e-mail: s.urazaeva@mail.ru

THE PROBLEM OF VACCINATION REJECTIONS AND WAYS OF SOLUTION

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.06

Abstract

Immunization against infectious diseases is the most cost-effective and affordable means of controlling infectious diseases. Despite the progress made, large outbreaks are periodically recorded in the world due to a decrease in immunization coverage due to a significant increase in the number of people who refuse vaccinations and low adherence of the population to vaccination.

The purpose of the study is to review the world literature on the problems of vaccination against infectious diseases. Publications were searched in PubMed, Web of Science, Scopus, ScienceDirect, The Cochrane Library and e-library databases using keywords.

The article presents current threats to reduce the rate of vaccination and anti-vaccination sentiment, which is manifested in the difficult epidemiological situation in the fight against vaccine-controlled infectious diseases in many countries. The reasons for the low immunization coverage are parental concerns about the safety of vaccines, and about possible adverse events after vaccination, and the growing activism of anti-vaccine and anti-vaccine movements. In some countries, parents' religious beliefs were more likely to influence acceptance or rejection of vaccination.

An analysis of the attitude of medical workers, especially doctors of various specialties, showed that their opinion clearly influenced the decision of parents to immunize their children. Scientific works show that sometimes doctors themselves experience a lack of information regarding various aspects of vaccination and give children unreasonable medical challenges.

The article also provides recommendations for improving information work with the population on immunization issues.

Keywords: vaccination, refusal to vaccinate, attitude towards vaccination, medical workers.

Vaccination is one of the most important areas of preventive medicine to protect the population from infectious diseases and is one of the greatest achievements of public health in the 20th century. Successful immunization programs are the result of the high efficacy of vaccines and their timely use. Vaccination is the main method of preventing infectious diseases. Despite the large number of available drugs, the creation of effective and safe vaccines is still an urgent task [1]. However, immunization is the most cost-effective and affordable means of controlling infectious diseases. Despite the progress made, large outbreaks of infectious diseases, in particular COVID 19, measles, influenza, Ebola and other diseases, are periodically recorded in the world, which is most likely due to a decrease in immunization coverage due to a significant increase in the number of people who refuse vaccinations, and a relatively low, compared with previous years, adherence to vaccination. Numerous studies have shown that immunization will be effective with concomitant support from the government and the medical community, taking into account local cultural characteristics of the population and effective approaches to vaccination. The attitude of medical workers to vaccination largely determines the opinions and decisions of adults and parents of children regarding the receipt of a vaccine. In this regard, one of the sections of the review is devoted to this issue.

The purpose of the study is a review of the world literature on the problems of vaccination against infectious diseases. The search for publications was carried out in databases PubMed, Web of Science, Scopus, ScienceDirect, The Cochrane Library and e-library using keywords. The following inclusion criteria were established: full-text articles in English or Russian, published in scientific journals for the last 5 years (2018-2022), taking into account the large volume of publications on the subject. Repeated publications and short messages are excluded.

Modern threats of decreasing rates of vaccination and anti-vaccination sentiments.

Currently, the world faces a complex epidemiological situation in the fight against vaccine-controlled infectious diseases, which is associated with the absence or a sharp decrease in the population's immunity in countries, including in areas of military conflicts, limited access to vaccines in some regions of the world, and refusals to vaccinate for various reasons. Long-term accumulation of the non-immune interlayer of the children's population is fraught with outbreaks and predominance of severe and complicated forms in adults.

Monitoring of documented vaccination is one of the indicators of the quality of epidemiological surveillance of vaccination. In [2], based on the analysis of preventive vaccination cards of 2687 children, the highest levels of vaccination and immunization coverage against tuberculosis infection (98.1% each), hepatitis B (85.9 and 96.5%), measles, rubella and mumps were revealed (84.4 and 93.9% respectively). Vaccination and coverage rates against whooping cough, diphtheria and tetanus (DTP vaccine), polio, pneumococcal disease and influenza were significantly reduced (60.5 and 94.9%), (65.0 and 94.9%), (27, 6 and 47.1%) and (5.8 and 30.5%) respectively.

In the Russian Federation, as of 2019, there is still an increase in the incidence of measles in the context of the WHO Measles Elimination Program by 2020 due to low coverage of the population with preventive vaccinations [3].

A decrease in vaccine purchases and an increase in anti-vaccination sentiment in Ukraine have led to a sharp decline in vaccination coverage against all infections since 2009. The high incidence of measles among children and adults is supported by a long-term low vaccination coverage of target groups of the child population: coverage from 95% in 2016 decreased to a critical 44.8%. The extremely unfavorable epidemiological situation associated with measles is maintained due to the complete absence of anti-epidemic measures, combined with the economic crisis and political instability in the country [4].

In a study of Kazakhstani scientists, low vaccination coverage of children under 1 year old was 50.2% (n=4098), from 1 year to 14 years old 49.8% (n=4072) which is associated with various reasons (not reaching the age, medical rejection parental refusal to vaccinate). An epidemiological analysis of the incidence of measles over 10 years revealed an upward trend and amounted to 13,873 cases, of which 73% (n=10189) were children under 14 years of age [5].

In the Republic in 2019, children under 1 year old who did not have time to receive the first dose of the vaccine, and adults over 20 years of age fell ill with measles. Children vaccinated according to the National Immunization Schedule were less ill [6].

Information coming from informal sources such as social media, private blogs and websites plays a huge role in decision-making regarding immunization. Analyzing information about people's sentiments about COVID-19 vaccination is one way to get a reliable picture of public opinion and allows government and health experts to understand public ideas and perceptions about vaccines to develop efforts to engage and educate about the benefits of vaccines [7-9].

The attitude of the population to vaccination and the reasons for refusals.

Despite the fact that vaccines save many lives around the world, in many countries, the percentage of unvaccinated children is constantly growing. The main reasons for low immunization coverage are parental concerns about the safety of vaccines, their concerns about possible adverse events after vaccination, and the growing activism of anti-vaccination movements.

In a study in Turkey, participants who had never received a flu vaccine accounted for 78.4%; only 13.4% were vaccinated occasionally, and 8.1% received regular annual vaccinations.

Influenza vaccination rates were higher in married people ($p < 0.001$), women ($p = 0.005$), patients with chronic lung and cardiovascular diseases ($p < 0.001$), people over 65 years of age / residents of nursing homes ($p < 0.001$). Awareness of the benefits of the vaccine was higher in the high-risk influenza group ($p < 0.001$) [10].

More than half of the parents surveyed ($n = 156$; 56.12%) indicated that they were aware of the existence of anti-vaccination movements. One-third ($n = 91$; 32.73%) reported that they know vaccine supporters in their social circle. Approximately half ($n = 126$; 45.32%) were familiar with the arguments against vaccination. Awareness of anti-vaccination movements and familiarity with their arguments significantly correlate with living in a large city (respectively, $p < 0.004$, $p < 0.003$, $p < 0.0003$), higher income ($p < 0.004$, $p < 0.001$, $p < 0.0009$) and a higher level of education ($p < 0.000001$, $p < 0.008$, $p < 0.000001$). However, the majority of parents reporting familiarity with anti-vaccination movements (53.85% vs 40.16%, $p < 0.05$) or anti-vaccination supporters (65.94 vs 39.04%, $p < 0.0001$) or their opinions (59.52% vs 38.16%, $p < 0.001$) were still administering these vaccinations [11].

An in-depth interview with 20 mothers in Poland showed that 40% of mothers had a secondary education, 75% ($n = 15$) did not work, and 45% ($n = 9$) had their first children. It has been found that mothers do not know what immunization means. Breast milk and propolis, herbal products and spiritual practices are among the traditional methods used to boost immunity and protect against disease. Most mothers were against vaccination due to the fact that the vaccine was produced in another country, they believed that it causes autism, contains harmful substances, and the vaccinated child becomes even sicker [12].

The results of another Polish study show that most parents are aware of the anti-vaccination movements and have a negative attitude towards them, but these movements still influence the public. In addition, the results show a correlation between the level of education and general attitudes towards immunization - people with higher education are more likely to have a negative opinion on this issue [13].

In 2017, the Italian government introduced mandatory vaccinations for 10 diseases for Italian schoolchildren in response to an alarming drop in coverage and a measles outbreak. The Italian National Institute conducted an analysis of the socio-cultural profile of the respondents who were opposed to vaccination.

Among those surveyed, 19% believed that vaccines were harmful, and 10% did not trust the scientific community about vaccines. Of the respondents who believed in the harm of vaccines, 29% did not trust the scientific community. Principal component analysis showed that the anti-vaxxer group was characterized by low participation in political and cultural life, were male, older and had a lower level of education [14].

Definitely, socio-cultural norms influence people's beliefs about vaccination. The authors' article outlines the views that culture, traditions, normative beliefs, and religion influence hesitancy about human papillomavirus (HPV) vaccination in Asian countries. The paper highlights the problems associated with hesitancy in HPV vaccination among parents, young and adult women, men and representatives of sexual and gender minorities in Asian countries [15].

The results of a national qualitative study of the experience, observations and opinions of health workers about the beliefs, socio-economic, cultural and environmental characteristics of parents who refuse vaccination were presented in 12 regions of Turkey. mother's pregnancy. It was recommended to use visual cards with scientific data on the composition of the vaccine and disease prevention when consulting parents, describing the components of the vaccine in an accessible form, informing about the national system of quality control and vaccine production, engaging opinion leaders and considering reducing taxes for parents whose children are completely vaccinated [16].

In the review by M.A. Galitskaya [17] with co-authors, an analysis of scientific data on the directions, trends and extreme danger of anti-vaccination movements is presented in detail. The development of this movement in recent years is associated with many reasons, first of all, with the "forgetting" by the population of the danger and severity of many infectious diseases and the

consequences of epidemics, as well as the availability of any information on the Internet. The paper outlines WHO proposals for overcoming barriers to the adoption and use of vaccines [17].

An analysis of the views on vaccination of representatives of the world's largest religions showed that none of the religions represented has a ban on vaccinations, on the contrary, they are often considered mandatory to save lives. The put forward religious reasons for the refusal of immunization reflect the low awareness of society about the history of the appearance of vaccination (variolation), which began in India among representatives of the Brahmin caste, priests and spiritual mentors [18].

Medical exemptions were the main reason for non-vaccination in 89.8% of partially unvaccinated and 82.5% of fully unvaccinated children. Among the subjective reasons for complete and partial refusals of vaccination, the majority of mothers named the fear of post-vaccination complications (66.7% with complete and 69.7% with partial refusals) and the conviction that there is no risk of contracting infectious diseases (64.1% and 81.3%, respectively). Parental prejudice against vaccination was the reason for refusal of vaccination in 24.4% of cases against hepatitis B and 22.2% against tuberculosis. Young women 15-19 years of age were less likely than mothers from other age groups to refuse vaccinations for their children. 22.7% of mothers whose children were fully vaccinated, according to the National vaccination calendar, had doubts about the advisability of vaccination. 91.1% of the mothers participating in the study indicated the Internet as one of the main sources of obtaining information about vaccination. It is alarming that the share of respondents who received information from medical professionals was only 31.4% [19].

In many cases, refusal to vaccinate is the result of people listening to beliefs and copying the behavior of others. An important consequence of this misperception is the potential involvement in the spread of an infectious pathogen due to the false belief that "vaccination is harmful". Thus, ensuring the success of the continuity of immunization programs is the responsibility of citizens, health professionals and government [20].

According to the results of a study by T.A. Kalyuzhnaya [21] and co-authors, in most cases, the attitude of parents to vaccination was positive, one in three of them believed that they were fully informed about immunization issues and more than half wanted to be vaccinated only within the framework of the national calendar of preventive vaccinations. In almost 100% of cases, parents trusted information about vaccinations received from a doctor. The results of the Aston Group survey showed that neurologists, immunologists and surgeons gave the most frequent medical challenges.

The data of a cross-sectional multicenter study on the awareness of 1620 parents in matters of vaccination revealed factors influencing a decrease in confidence in vaccination. The majority of respondents (n=1590) vaccinated their children following the recommendations of the National Calendar, 25% of parents additionally vaccinated them according to epidemic indications. The refusal of vaccination in 2% of respondents was influenced by the level of education (incomplete secondary), the financial situation of the family (average or above average), the choice of mass media as the prevailing source of information about vaccinations. There is a high degree of respondents' trust in the opinion of the local pediatrician (91.7%) and the interest of parents in obtaining additional information about vaccinations (71.2%) [22].

In this study, we studied the social portrait of a family that refuses to vaccinate children and revealed differences in the social status of mothers of newborns and children 2-3 years old. In the maternity hospital, the least committed to vaccination of children were young mothers (74.2%), having 2 or more children, married (57.5%), with secondary or secondary specialized education (58%). The refusals from previous vaccinations of children 2-3 years old were most often resorted to by young mothers of the first child, with a higher (65%) (in 48.5% - medical) education, with an average level of income (60%). In more than half of the cases, the family had one child (65.5% of families), complete, socially prosperous families prevailed [23].

Over 36% of those surveyed showed hesitation about a COVID-19 vaccine in Kazakhstan. COVID-19 vaccine hesitancy was high among females ($p = 0.02$), aged 30 years and over ($p <$

0.001), widowed or divorced ($p < .001$), and those with a child ($p < 0.001$). One of the most influential factors influencing vaccine hesitancy is the country of origin of the vaccines [24].

The attitude of medical workers to vaccination.

Of particular interest is the attitude of doctors of various specialties to vaccination, which is ambiguous.

National immunization guidelines in Central Africa and the Caribbean generally do not include routine vaccination recommendations for all adults, but rather focus on those with risk factors. This applies to immunization against influenza, pneumococcus and hepatitis B. In general, there is a lack of knowledge among health professionals and the general public. Furthermore, medical students lack sufficient information on vaccinology. Action by responsible authorities – medical schools and scientific societies that can advocate for vaccination and better knowledge of vaccinology – can help address these issues. A culture of preventive medicine in the workplace can help shape public opinion about vaccination. Education and research on vaccination could be promoted in an ethical and transparent manner through working groups formed by disease experts, the public and private sectors and supranational authorities [25].

To assess the opinions of doctors about immunoprophylaxis, 512 doctors of various specialties were interviewed. Analysis of the questionnaires showed that 80% of respondents have a positive attitude towards immunoprophylaxis, but more than 50% lack convincing reliable information about it. Thus, an information deficit has been revealed in relation to various aspects of vaccination [26].

A sociological study of 1384 medical workers in 4 regions of Ukraine showed that 87.6% of medical workers generally have a positive attitude towards preventive vaccinations. 80.7% of medical workers vaccinate their children in accordance with the National Immunization Schedule, 15.4% - with some deviations from it, and only 12.7% - carry out additional immunoprophylaxis in excess of the required list. It was revealed that most often doctors-specialists (8.6%) refused to vaccinate their children due to the obvious overdiagnosis of contraindications to vaccinations and the greater spread of anti-vaccination guidelines. It is shown that medical workers themselves are insufficiently revaccinated against diphtheria and tetanus - only 74.6% regularly and 7.9% less than once every ten years; at the same time, doctors from among narrow specialists turned out to be the least disciplined. It was revealed that the adherence of medical workers to vaccination of children and their own revaccination increases with age, depends on the region and group of professional activity, as well as on the fact of undergoing special training in the organization of immunoprophylaxis [27].

A survey of students revealed insufficient knowledge of the National Immunization Schedule, as well as numerous misconceptions about preventive vaccinations by pediatricians (especially pediatric neurologists and pediatric allergist-immunologists), a cautious attitude towards vaccination and trust in “myths” about vaccinations among legal representatives of patients [21].

A survey of medical workers in the Republic of Tatarstan covering 3,250 people revealed that a significant part (95%) of medical workers have a positive attitude towards vaccination, vaccinated themselves and vaccinated their children. 89.9% of medical workers support the initiative to abolish the right of citizens to refuse vaccination. The main components of the successful organization of vaccination in a medical organization, according to medical workers, are the availability and variety of vaccines, the level of qualification of medical personnel and the equipment of the vaccination room [28].

Successful communication is based on the doctor's ability to build a trusting dialogue based on confidence in the goodwill of all its participants. For doubting patients, the doctor is one of the most significant sources of information about vaccinations. The ability of a doctor to clearly and confidently build a dialogue about vaccination allows you to dispel the patient's doubts and is the most effective means of increasing the adherence of the population to immunization [29].

A study by Senkevich et al., 2021 [23] established the priority of a pediatrician as a source of information about the vaccination of children and a high level of trust in public health

institutions in matters of vaccination. A generally positive attitude towards vaccination was revealed. However, some parents, whose children can be a reserve for increasing the layer of timely vaccinated children, are aware of the importance of vaccination as protection against infections, but justifiably (due to medical contraindications) or unreasonably postpone it indefinitely.

Conclusion

Thus, based on the analysis of reference sources on the reasons for refusals to vaccinate, the following can be distinguished: lack of or insufficient awareness of the population, including parents; a tendency to believe "myths" about the dangers of vaccination; fear of post-vaccination reactions and complications; belief in the absence of the risk of contracting infectious diseases; trusting fake information from the Internet; commitment to anti-vaccine movements in some countries; the use of non-traditional methods to increase immunity; distrust of vaccines produced in other countries. The negative opinion of medical workers about vaccines, the insufficient level of knowledge of narrow specialists on vaccination issues, especially among neurologists, led to a rather high level of medical rejections in children. The researchers noted that doctors do not always have sufficient communication skills to build the right dialogue with parents.

Recommendations from health professionals included activities such as: (1) using visual cards with scientific data on vaccine composition and disease prevention to advise patients, (2) describing vaccine components in an accessible and visual form, (3) highlighting national quality control and production on vaccine packaging and labels, (4) conducting interviews with opinion leaders, (5) training key people to work with the public on vaccines. Government measures may include tax cuts for parents whose children are fully vaccinated.

Funding

The work was carried out within the framework of the scientific project «The impact of vaccination on immunity in patients with a condition after COVID 19 among the population of Kazakhstan» (IRN AP14870878) for 2022-2024, funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Isabek A.U., Bopi A.K., Ahmet R.A., et al., Metod povysheniya effektivnosti polucheniya rekombinantnyh virusov effektivnosti polucheniya rekombinantnyh virusov nodulyarnogo dermatita dlya razrabotki vektornyh vakcin. *Mikrobiologiya i virusologiya*, 2023, 2(41): 65-80 (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.04)
- 2 Namazova-Baranova L.S., Fedoseenko M.V., Grinchik P.R., et al., Privitost' i ohvat immunizaciej v sootvetstvii s nacional'nym kalendarem profilakticheskikh privivok detskogo naseleniya: odnomomentnoe mnogocentrovoe issledovanie. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2021;18(2):110-117. (DOI: 10.15690/pf.v18i2.2218)
- 3 E.V. Rusakova, T. A. Semenenko, A. V. Nozdracheva, N. V. Rusakov, Kor': problemy na etape eliminacii/Izvestiya GGTU. *Medicina, farmaciya*. 2020. № 3. S. 52-59 (<https://izvestiya.ggtu.ru/journal-issue/>)
- 4 Zadorozhnaya V. I. Kor' v Ukraine: neob'yavlenaya epidemiya. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya*.2019.T.8,№2.S.150-157(<https://elibrary.ru/item.asp?id=38518646>)
- 5 ZHuzzhasarova A.A., Baesheva D.A., Turdalina B.R., et al., Pokazatel' vakcinal'nogo statusa i zabolevaemosti kor'yu v Respublike Kazahstan. *Nauka i Zdravoohranenie*. 2021. 4(T.23). S. 155-162. (doi 10.34689/SH.2021.23.4.017)
- 6 M.K. Gabasova, A. B. Daniyarova, L. ZH. Alekesheva, et al., Epidemiologicheskaya situaciya po kori v Respublike Kazahstan po dannym retrospektivnogo analiza. *Vestnik Kazahskogo nacional'nogo medicinskogouniversiteta*.2020,№1.S.388-393(URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskaya-situatsiya-po-kori-v-respublike-kazahstan-po-dannym-retrospektivnogo-analiza>)

- 7 Lyu H, Wang J, Wu W, et al., Social media study of public opinions on potential COVID-19 vaccines: informing dissent, disparities, and dissemination. *Intell Med.* 2022 Feb;2(1):1-12. (doi: 10.1016/j.imed.2021.08.001)
- 8 Ruoyan Sun, Henna Budhwani, Negative sentiments towards novel coronavirus (COVID-19) vaccines. *Vaccine.* – 2022.; 40(48): 6895-6899. (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.10.037)
- 9 Han Xu, Ruixin Liu, Ziling Luo, Minghua Xu. COVID-19 vaccine sensing: Sentiment analysis and subject distillation from twitter data. *Telematics and Informatics Reports.* 2022. 8:100016.(doi: 10.1016/j.teler.2022.100016)
- 10 Goktas, O., Can, F. E., Yakar, et al., Seasonal influenza vaccine awareness and factors affecting vaccination in Turkish Society. *Pakistan Journal of Medical Sciences,* 2022. 38(4). (doi: 10.12669/pjms.38.4.4915)
- 11 Łoś-Rycharska E, Popielarz M, Wolska J, et al., The antivaccination movement and the perspectives of Polish parents. *Pediatrics Polska - Polish Journal of Pediatrics.* 2022;97(3):183-192. (doi:10.5114/polp.2022.117913)
- 12 Atasever BN, Sayar S, Sabancı M, et al., Vaccine rejection for parents with babies of 0-24 months: Solution recommendations for causes and reduction. *J Pediatr Inf* 2021;15(2): e97-e102. (DOI: 10.5578/ced.202119805)
- 13 Pisaniak P, Tarczon A, Konarska M, Ozga D. Parents' Opinions and Knowledge About Vaccination in Poland - A Cross-Sectional Observational Study. *Int J Gen Med.* 2021; 14:3235-3242 (doi: 10.2147/IJGM.S302699)
- 14 Cadettu C, Daugbjerg S, Ricciardi W, Rosano A. Beliefs towards vaccination and trust in the scientific community in Italy. *Vaccine.* 2020 Sep 29;38(42):6609-6617.(doi: 10.1016/j.vaccine.2020.07.076)
- 15 Li Ping Wong, Pooi-Fong Wong, Megat Mohamad Amirul Amzar Megat Hashim, et al., Multidimensional social and cultural norms influencing HPV vaccine hesitancy in Asia, *Human Vaccines & Immunotherapeutics,* 2020. 16:7, 1611-1622. (DOI: 10.1080/21645515.2020.1756670)
- 16 Yalçın S.S., Bakacak A.G. & Topaç O. Unvaccinated children as community parasites in National Qualitative Study from Turkey. *BMC Public Health* 20, 1087 (2020). (doi: 10.1186/s12889-020-09184-5)
- 17 Galickaya M.G., Fisenko A.P., Tatochenko V.K., et al., Vakcinoprofilaktika i ee protivniki v sovremennom mire. *Rossijskij pediatricheskij zhurnal.* 2021; 24(6): 424–432. (doi: 10.46563/1560-9561-2021-24-6-424-432)
- 18 G. Pelčić, S. Karačić, G. L. Mikirtichan, et al., Religioznye vozrazheniya dlya vakcinacii ili religioznye opravdaniya dlya ukлонeniya ot vakcinacii: dejstvitel'no li oni sushchestvuyut? *Medicina i organizaciya zdravoohraneniya.* 2020.T.5,№1.S.58-78. (<https://ojs3.gpmu.org/index.php/medorg/article/view/2372>)
- 19 Moiseeva K.E., Alekseeva A.V. Osnovnye prichiny otkazov ot vakcinacii. *Social'nye aspekty zdorov'ya naseleniya [setevoe izdanie]* 2019; 65(5):9. (DOI: 10.21045/2071-5021-2019-65-5-9)
- 20 Pivovarova O.A., Kuraeva V.M. Mezhdunarodnye aspekty antivakcinatorstva: posledstviya dlya obshchestvennogo zdravoohraneniya (obzor literatury). *Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii.* 2022;66(6):542-548. (doi: 10.47470/0044-197X-2022-66-6-542-548)
- 21 Kalyuzhnaya T.A., Fedoseenko M.V., Namazova-Baranova L.S., et al., Preodolenie antiprivivochnogo skepsisa: poiski resheniya vyhoda iz slozhivshejsya situacii. *Pediatriceskaya farmakologiya.* 2018;15(2):141-148. (DOI: 10.15690/pf.v15i2.1871)
- 22 Vanyarkina A.S., Petrova A.G., Bayanova T.A., et al., Vakcinoprofilaktika u detej: znaniya roditelej ili kompetenciya vracha. *Tihookeanskij medicinskij zhurnal.* 2019;(4):23-28. (DOI: 10.34215/1609-1175-2019-4-23-28)
- 23 Senkevich O.A., Plotonenko Z.A., Molochnyj V.P., Kaplieva O.V. Social'no-demograficheskie harakteristiki semej, otkazyvayushchihsya ot vakcinacii, i prichiny otkaza. *Infekciya. bolezni (infekcionnye zabolovaniya).* 2021; 19(1): 124-130. (DOI: 10.20953/1729-9225-2021-1-124-130)
- 24 AlpamysIssanov, ZylkiyaAkhmetzhanova, Dieter Riethmacher& Mohamad Aljofan, Knowledge, attitude, and practice toward COVID-19 vaccination in Kazakhstan: a cross-sectional study, *Human Vaccines & Immunotherapeutics,* 2021.17:10, 3394-3400, (doi: 10.1080/21645515.2021.1925054)
- 25 Laura Naranjo, Elidia Domínguez, Carlos Rodriguez, Reynaldo Chandler, et al., Adult immunization practices, challenges and opportunities in Central America and the Caribbean: Advisory board proceedings, *Human Vaccines & Immunotherapeutics,*2022. 18:7 (DOI: 10.1080/21645515.2022.2129236)

26 Galina N. P. Otnoshenie k immunoprofilaktike vrachej razlichnyh special'nostej. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika*. 2018. T. 17, № 3(100). S. 74-79. (DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-74-79.)

27 Beketova G.V., Bulavinova E.A., Decik O.Z., et al., Priverzhennost' medicinskih rabotnikov k vakcinacii. *Pediatriya. Vostochnaya Evropa*. 2021. T.9, №2. S. 166-175. (DOI: 10.34883/PI.2021.9.2.002.)

28 Lopushov D.V., Trifonov V.A., Imamov A.A., et al., Otnoshenie medicinskih rabotnikov k vakcinacii na sovremennom etape. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2018. T. 99. №5. C. 812-817. (doi: 10.17816/KMJ2018-812)

29 Ermolenko K.D., Harit S.M., Ruleva A.A., et al., Postroenie dialoga s pacientom o vakcinacii (nauchnyj obzor). *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika*. 6. 2021;20(1):114-124. (DOI: 10.31631/2073-3046-2021-20-1-114-124)

С.Т. УРАЗАЕВА^{1*}, Т. БЕГАЛИН¹, В.С. ТОЙГОМБАЕВА², А.Б. УРАЗАЕВА¹,
А.А. АМАНШИЕВА¹, Г.Ж. НҰРМАҒАНБЕТОВА¹, Ш.М. НУРМУХАМЕДОВА¹,
Н.Е. ЕРБОЛАТ¹, Д.А. АЙДЫНҒАЛИЕВА¹

¹Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медицина университеті, Ақтөбе, Қазақстан

²Иса Коноевич Ахунбаев атындағы Қырғыз мемлекеттік медициналық академиясы,
Бішкек, Қырғызстан

*e-mail: s.urazaeva@mail.ru

ВАКЦИНАЦИЯДАН БАС ТАРТУ МӘСЕЛЕСІ ЖӘНЕ ОНЫ ШЕШУ ЖОЛДАРЫ

Түйін

Жұқпалы ауруларға қарсы иммундау жұқпалы ауруларды бақылаудың ең үнемді және қолжетімді құралы болып табылады. Қол жеткізілген жетістіктерге қарамастан, әлемде вакцинациядан бас тартатын адамдар санының айтарлықтай өсуіне және халықтың вакцинацияға деген ұмтылысының төмендеуіне байланысты иммундаумен қамтудың төмендеуіне байланысты ірі бұрқетулер тіркеледі.

Зерттеудің мақсаты-жұқпалы ауруларға қарсы вакцинация мәселелері бойынша әлемдік әдебиеттерге шолу. Басылымдарды іздеу PubMed, Web of Science, Scopus, ScienceDirect, the Cochrane Library және e-library дерекқорларында кілт сөздерді қолдана отырып жүргізілді.

Мақалада көптеген елдерде вакцинамен басқарылатын жұқпалы аурулармен күресудің күрделі эпидемиологиялық жағдайында көрінетін вакцинация мен вакцинаға қарсы көңіл-күйдің төмендеуінің заманауи қауіптері келтірілген. Иммунизациямен қамтудың төмендігінің себептері ата-аналардың вакциналардың қауіпсіздігіне қатысты алаңдаушылықтары, вакцинациядан кейінгі ықтимал жағымсыз құбылыстарға қатысты алаңдаушылықтары және вакцинацияға қарсы қозғалыстарға қарсылардың белсенділігінің артуы болып табылады. Кейбір елдерде ата-аналардың діни сенімдері вакцинацияны қабылдауға немесе қабылдамауға көбірек әсер етті.

Медицина қызметкерлерінің, әсіресе әртүрлі мамандықтағы дәрігерлердің қарым-қатынасын талдау олардың пікірі ата-аналардың балаларды иммундау туралы шешіміне әсер еткенін көрсетті. Ғылыми еңбектерде кейде дәрігерлердің өздері вакцинаның алдын алудың әртүрлі аспектілеріне қатысты ақпараттық тапшылықты бастан кешіретіні және балаларға негізсіз медициналық жауап беретіні көрсетілген.

Мақалада иммундау мәселелері бойынша халықпен ақпараттық жұмысты жақсарту бойынша ұсыныстар берілген.

Кілтті сөздер: вакцинация, вакцинациядан бас тарту, вакцинацияға көзқарас, медицина қызметкерлері.

С.Т. УРАЗАЕВА^{1*}, Т. БЕГАЛИН¹, В.С. ТОЙГОМБАЕВА², А.Б. УРАЗАЕВА¹,
А.А. АМАНШИЕВА¹, Г.Ж. НУРМАҒАНБЕТОВА¹, Ш.М. НУРМУХАМЕДОВА¹,
Н.Е. ЕРБОЛАТ¹, Д.А. АЙДЫНҒАЛИЕВА¹

¹Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова, Актобе,
Казахстан

²Кыргызская государственная медицинская академия имени Исы Коноевича Ахунбаева,
Бишкек, Киргизия

*e-mail: s.urazaeva@mail.ru

ПРОБЛЕМА ОТКАЗОВ ОТ ВАКЦИНАЦИИ И ПУТИ РЕШЕНИЯ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.06

Аннотация

Иммунизация против инфекционных болезней является наиболее экономически эффективным и доступным средством контроля инфекционной заболеваемости. Несмотря на достигнутые успехи, в мире периодически регистрируются крупные вспышки инфекций вследствие снижения охвата иммунизацией из-за существенного роста числа людей, отказывающихся от прививок и низкой приверженности населения к вакцинации.

Цель исследования - обзор мировой литературы по проблемам вакцинации против инфекционных болезней. Поиск публикаций проводился в базах данных PubMed, Web of Science, Scopus, ScienceDirect, The Cochrane Library и e-library использованием ключевых слов.

В статье представлены современные угрозы снижения темпов привитости и антивакцинальных настроений, что проявляется в сложной эпидемиологической ситуации по борьбе с вакциноуправляемыми инфекционными болезнями во многих странах. Причинами низкого охвата иммунизацией являются опасения родителей по поводу безопасности вакцин, их опасений, связанных с возможными нежелательными явлениями после вакцинации, и растущая активность движений против вакцинации. В некоторых странах религиозные убеждения родителей чаще влияли на принятие или отрицание вакцинации.

Анализ отношения медицинских работников, особенно врачей различных специальностей, показал, что их мнение однозначно влияло на принятие решения родителями об иммунизации детей. В научных работах показано, что иногда врачи сами испытывают информационный дефицит в отношении различных сторон вакцинопрофилактики и дают детям необоснованные медицинские отводы.

В статье также приведены рекомендации по улучшению информационной работы с населением по вопросам иммунизации.

Ключевые слова: вакцинация, отказ от прививок, отношение к вакцинации, инфекционные болезни, медицинские работники.

Вакцинация - одно из важнейших направлений профилактической медицины для защиты населения от инфекционных заболеваний - является одним из величайших достижений общественного здравоохранения в 20-м веке. Успешные программы иммунизации являются результатом высокой эффективности вакцин и их своевременного использования. Вакцинация является основным методом профилактики инфекционных заболеваний. Несмотря на большое количество доступных препаратов, создание эффективных и безопасных вакцин все еще остается актуальной задачей [1]. Вместе с тем иммунизация является наиболее экономически эффективным и доступным средством контроля инфекционной заболеваемости. Несмотря на достигнутые успехи, в мире периодически регистрируются крупные вспышки инфекционных заболеваний, в частности, COVID-19, кори, гриппа, лихорадки Эбола и других болезней, что скорее всего обусловлено снижением охвата иммунизацией из-за существенного роста числа людей, отказывающихся от прививок, и относительно низкой, по сравнению с предшествующими годами, приверженности вакцинации. Многочисленные исследования показали, что иммунизация будет результативной при сопутствующей поддержке со стороны правительства и

медицинского сообщества с учётом местных культурных особенностей населения и эффективных подходов к вакцинации. Отношение медицинских работников к вакцинации во многом определяет мнения и принятие решения взрослых и родителей детей относительно получения вакцины. В этой связи один из разделов обзора посвящен этому вопросу.

Цель исследования - обзор мировой литературы по проблемам вакцинации против инфекционных болезней. Поиск публикаций проводился в базах данных PubMed, Web of Science, Scopus, ScienceDirect, The Cochrane Library и e-library с использованием ключевых слов. Были установлены следующие критерии включения: полнотекстовые статьи на английском или русском языках, опубликованные в научных журналах за последние 5 лет (2018–2022 гг.) с учетом большого объема публикаций по тематике. Были исключены повторяющиеся публикации и краткие сообщения.

Современные угрозы снижения темпов привитости и антивакцинальных настроений.

На сегодняшний день в мире наблюдается сложная эпидемиологическая ситуация по борьбе с вакциноуправляемыми инфекционными болезнями, связанная с отсутствием или резким снижением показателей привитости населения в странах, в том числе в зонах военных конфликтов, ограничением доступа населения к вакцинам в некоторых регионах земного шара и отказами от вакцинации по различным причинам. Длительное накопление неимунной прослойки детского населения чревато вспышками и доминированием тяжелых и осложненных форм у взрослых.

Мониторинг документированной привитости - один из показателей качества эпидемиологического надзора за проведением вакцинопрофилактики. В работе [2] на основе анализа карт профилактических прививок 2687 детей выявлены наибольшие уровни привитости и охвата иммунизацией против туберкулезной инфекции (по 98,1%), гепатита В (85,9 и 96,5%), кори, краснухи и эпидемического паротита (84,4 и 93,9%, соответственно). Уровень привитости и охвата прививками против коклюша, дифтерии и столбняка (вакцина АКДС), полиомиелита, пневмококковой инфекции и гриппа было значительно снижено (60,5 и 94,9%), (65,0 и 94,9%), (27,6 и 47,1%) и (5,8 и 30,5%), соответственно.

В Российской Федерации по состоянию на 2019 год по-прежнему отмечается рост показателя заболеваемости корью в условиях действия Программы ВОЗ по элиминации кори к 2020 году из-за низкого охвата населения профилактическими прививками [3].

Уменьшение объема закупок вакцин и активизация антивакцинальных настроений в Украине привели к резкому снижению уровня охвата вакцинацией против всех инфекций с 2009 года. Высокая заболеваемость корью среди детей и взрослых поддерживается за счет длительного низкого охвата вакцинацией целевых групп детского населения: охват от 95% в 2016 году снизился до критических 44,8%. Крайне неблагоприятная эпидемиологическая ситуация, связанная с корью, поддерживается за счет полного отсутствия противоэпидемических мероприятий в сочетании с экономическим кризисом и политической нестабильностью в стране [4].

В исследовании казахстанских ученых выявлен низкий охват вакцинацией детей до 1 года 50,2% (n=4098), от 1 года до 14 лет 49,8% (n=4072), который связан с разными причинами (не достижение возраста, медицинский отвод, отказ родителей от вакцинации). Эпидемиологический анализ заболеваемости корью за 10 лет выявил тенденцию к росту и составил 13 873 случая, из них 73% (n=10189) - дети до 14 лет [5].

В Республике Казахстан в 2019 году заболели корью дети до 1 года, не успевшие получить первую дозу вакцины, и взрослые лица старше 20 лет. Привитые по Национальному календарю прививок дети болели в меньшей степени [6].

Огромную роль в принятии решения в отношении иммунопрофилактики играет информация, поступающая из неофициальных источников, таких как социальные сети, частные блоги и веб-сайты. Анализ информации о настроениях людей в отношении вакцинации против COVID-19 является одним из способов получения достоверной картины общественного мнения и позволяет правительству и экспертам в области здравоохранения

понять общественные идеи и представления о вакцинах для разработки усилий по вовлечению и просвещению о преимуществах вакцинации [7 - 9].

Отношение населения к вакцинации и причины отказов.

Несмотря на то, что вакцины спасают множество жизней во всем мире, во многих странах, процент невакцинированных детей постоянно растет. Основными причинами низкого охвата иммунизацией являются опасения родителей по поводу безопасности вакцин, их опасения, связанные с возможными нежелательными явлениями после вакцинации, и растущая активность движений против вакцинации.

В исследованиях, проведенных в Турции, участники, которые никогда не получали вакцину против гриппа, составили 78,4%; только 13,4% время от времени вакцинировались, а 8,1% получали регулярную ежегодную вакцинацию. Показатели вакцинации против гриппа были выше у женатых людей ($p < 0,001$), женщин ($p = 0,005$), пациентов с хроническими заболеваниями легких и сердечно-сосудистой системы ($p < 0,001$), лиц старше 65 лет / жителей домов престарелых ($p < 0,001$). Осведомленность о пользе вакцины была выше в группе высокого риска гриппа ($p < 0,001$) [10].

Более половины опрошенных родителей ($n=156$; 56,12%) указали на осведомленность о существовании движений против вакцинации. Одна треть ($n = 91$; 32,73%) сообщили, что знают сторонников вакцинации в своем кругу общения. Примерно половина ($n = 126$; 45,32%) были знакомы с аргументами против вакцинации. Осведомленность о движениях против вакцинации и знакомство с их аргументами достоверно коррелируют с проживанием в крупном городе (соответственно, $p < 0,004$, $p < 0,003$, $p < 0,0003$), наличием более высокого дохода ($p < 0,004$, $p < 0,001$, $p < 0,0009$) и более высоким уровнем образования ($p < 0,000001$, $p < 0,008$, $p < 0,000001$). Однако большинство родителей, сообщивших о знакомстве с антивакцинационными движениями (53,85% против 40,16%, $p < 0,05$) или сторонниками антивакцинации (65,94 против 39,04%, $p < 0,0001$) или их мнения (59,52% против 38,16%, $p < 0,001$), все еще давали согласие на эти прививки [11].

Проведенное в Польше углубленное интервью 20 матерей, выразивших отказ от вакцинации, показало, что 40% матерей имели среднее образование, 75% ($n=15$) - не работают, а у 45% ($n= 9$) – первые дети. Было установлено, что матери не знают, что означает иммунизация. Грудное молоко и прополис, растительные продукты и духовные практики входят в число традиционных методов, используемых для укрепления иммунитета и защиты от болезней. Большинство матерей были против вакцинации из-за того, что вакцина производилась в другой стране, считали, что вакцина вызывает аутизм, содержит вредные вещества, и привитый ребенок становится еще более больным [12].

Результаты другого польского исследования свидетельствуют о том, что большинство родителей знают о движениях против вакцинации и негативно относятся к ним, но эти движения все еще влияют на общественность. Кроме того, результаты показывают корреляцию между уровнем образования и общим отношением к иммунизации – люди с высшим образованием чаще имеют негативное мнение по этому вопросу [13].

В 2017 году итальянское правительство ввело обязательную вакцинацию для итальянских школьников от десяти заболеваний в ответ на тревожное сокращение охвата прививками и вспышку кори в стране. Итальянским национальным институтом анализа государственной политики был проведен анализ социально-культурного профиля респондентов – противников вакцинации.

Среди опрошенных 19% считали, что вакцины вредны, а 10% не доверяли научному сообществу в отношении вакцин. Из респондентов, которые считали, что вакцины вредны, 29% не доверяли научному сообществу. Анализ основных компонентов показал, что группа антиваксеров характеризовалась низким участием в политической и культурной жизни, были мужчинами, старше по возрасту и имели более низкий уровень образования [14].

Однозначно, социально-культурные нормы оказывает влияние на убеждения людей относительно вакцинации. В статье авторов излагаются мнения, согласно которым культура, традиции, нормативные убеждения и религия влияют на нерешительность в

отношении вакцинации против вируса папилломы человека (ВПЧ) в азиатских странах. В работе освещены проблемы, связанные с нерешительностью при вакцинации против ВПЧ среди родителей, молодых и взрослых женщин, мужчин и представителей сексуальных и гендерных меньшинств в азиатских странах [15].

Результаты национального качественного исследования опыта, наблюдений и мнений работников здравоохранения об убеждениях, социально-экономических, культурных и экологических характеристиках родителей, отказывающихся от вакцинации, проведенных в 12 регионах Турции, свидетельствуют о том, что решение проблемы отказа от вакцины начинается с правильного подхода к вакцинации во время беременности матери. Было рекомендовано использовать визуальные карточки с научными данными о составе вакцины и профилактике заболеваний при консультировании родителей, описание компонентов вакцины в доступной форме, информирование о национальной системе контроля качества и производства вакцин, привлечение лидеров общественного мнения и рассмотрение вопроса снижения налогов для родителей, чьи дети полностью вакцинированы [16].

В обзоре М.А.Галицкой с соавторами подробно представлен анализ научных данных о направлениях, тенденциях и чрезвычайной опасности антивакцинальных движений. Развитие этого движения в последнее время связано с множеством причин, прежде всего, с «забыванием» населением опасности и тяжести многих инфекционных болезней и последствий эпидемий, а также доступностью любой информации в интернете. В работе изложены предложения ВОЗ по преодолению барьеров на пути к принятию и использованию вакцин [17].

Анализ взглядов на вакцинацию представителей крупнейших мировых религий показал, что ни в одной из представленных религий нет запрета на прививки, наоборот, они часто считаются обязательными для спасения жизней. Выдвигаемые религиозные причины отказа от иммунизации отражают малую информированность общества об истории появления прививки (вариоляция), начало которой было положено в Индии среди представителей касты браминов, жрецов и духовных наставников [18].

Медицинские отводы являлись главной причиной отказа от прививок у 89,8% частично непривитых и 82,5% полностью непривитых детей. Среди субъективных причин полных и частичных отказов от вакцинации большинство матерей называли боязнь поствакцинальных осложнений (66,7% - при полных и 69,7% - при частичных отказах) и убежденность в отсутствии риска заражения инфекционными заболеваниями (64,1% и 81,3%, соответственно). Предубеждение родителей против прививок служило причиной отказа от вакцинации в 24,4% случаях против гепатита В и 22,2% - против туберкулеза. Молодые женщины 15–19 лет реже, чем матери из других возрастных групп отказывались от прививок своих детей. У 22,7% матерей, дети которых были полностью привиты, согласно Национальному прививочному календарю, возникали сомнения по поводу целесообразности проведения вакцинации. 91,1% матерей, участвовавших в исследовании, указали одним из основных источников получения сведений о вакцинопрофилактике сеть «Интернет». Настораживает тот факт, что доля респондентов, получивших информацию от медицинских работников, составила лишь 31,4% [19].

Во многих случаях отказ от вакцинации является следствием того, что люди прислушиваются к убеждениям и копируют поведение других. Важным следствием такого неправильного восприятия является потенциальное участие в распространении инфекционного патогена из-за ложного убеждения «вреда вакцинации». Таким образом, обеспечение успеха непрерывности программ иммунизации является обязанностью граждан, медицинских работников и правительства [20].

По результатам исследования Т.А.Калюжной [21] с соавторами в большинстве случаев отношение родителей к вакцинации было позитивным, каждый третий из них считал, что полностью информирован в вопросах иммунизации и больше половины хотели прививаться только в рамках национального календаря профилактических прививок. Практически в 100% случаев родители доверяли информации о прививках, полученной от

врача. Результаты опроса компании Aston Group показали, что самые частые медотводы давали неврологи, иммунологи и хирурги.

Данные кросс-секционного многоцентрового исследования об информированности 1620 родителей в вопросах вакцинопрофилактики выявили факторы, влияющие на снижение доверия к вакцинации. Большинство респондентов ($n=1590$) прививали детей, соблюдая рекомендации Национального календаря, 25% родителей дополнительно вакцинировали их по эпидемическим показаниям. На отказ от вакцинации у 2% респондентов оказывал влияние уровень образования (неполное среднее), финансовое положение семьи (среднее или выше среднего), выбор средств массовой коммуникации в качестве преобладающего источника информации о прививках. Отмечается высокая степень доверия респондентов к мнению участкового врача-педиатра (91,7%) и заинтересованность родителей в получении дополнительных сведений о прививках (71,2%) [22].

В данном исследовании изучен социальный портрет семьи, отказывающейся от вакцинации детей, и выявлены отличия в социальном статусе матерей новорожденных и детей 2-3 лет. В родильном доме наименее привержены вакцинопрофилактике детей были молодые матери (74,2%), имеющие 2 и более детей, состоящие в зарегистрированном браке (57,5%), со средним или средне-специальным образованием (58%). К отказам от предыдущих вакцинаций детей 2–3 летнего возраста наиболее часто прибегали молодые матери первого ребенка, с высшим (65%) (в 48,5% - медицинским) образованием, со средним уровнем достатка (60%). Более чем в половине случаев в семье был один ребенок (65,5% семей), преобладали полные, социально благополучные семьи [23].

Более 36% опрошенных показали нерешительность в отношении вакцины от COVID-19 в Казахстане. Нерешительность вакцины против COVID-19 оказалась высокой среди респондентов женского пола ($p = 0,02$), в возрасте 30 лет и старше ($p < 0,001$), овдовевших или разведенных ($p < 0,001$) и тех, у кого есть ребенок ($p < 0,001$). Одним из наиболее влияющих факторов, является страна происхождения вакцин [24].

Отношение медицинских работников к вакцинации.

Отдельный интерес представляет отношение врачей различных специальностей к вакцинации, которое является неоднозначным.

Национальные руководства по иммунизации в Центральной Африке и стран Карибского бассейна обычно не включают рекомендации по регулярной вакцинации для всех взрослых, а скорее сосредоточены на тех, у кого есть факторы риска. Это касается иммунизации против гриппа, пневмококка и гепатита В. В целом, не хватает знаний у медицинских работников и широкой общественности. Более того, недостаточно информации по вакцинологии для студентов медицинских вузов. Действия ответственных органов власти – медицинских школ и научных обществ, которые могут выступать за вакцинацию и более глубокие знания в области вакцинологии, – могут помочь решить эти проблемы. Культура профилактической медицины на рабочем месте может способствовать формированию общественного мнения о вакцинации. Этичным и прозрачным образом можно было бы содействовать просвещению и исследованиям в области вакцинации с помощью рабочих групп, сформированных экспертами по болезням, государственным и частным секторами и наднациональными органами власти [25].

Для оценки мнений врачей об иммунопрофилактике было опрошено 512 врачей различных специальностей. Анализ анкет показал, что 80% респондентов относятся к иммунопрофилактике положительно, однако более 50% испытывают недостаток в убедительной достоверной информации о ней. Таким образом, выявлен информационный дефицит в отношении различных сторон вакцинопрофилактики [26].

Социологическое исследование 1384 медицинских работников 4 областей Украины показало, что 87,6% медицинских работников в целом положительно относятся к профилактическим прививкам. 80,7% медицинских работников вакцинируют своих детей в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок, 15,4% - с

некоторыми отклонениями от него и только 12,7% - осуществляют дополнительную иммунопрофилактику свыше необходимого перечня. Выявлено, что чаще всего отказывались вакцинировать своих детей врачи-специалисты (8,6%) вследствие очевидной гипердиагностики противопоказаний к прививкам и большего распространения антивакцинальных установок. Показано, что медицинские работники сами недостаточно ревакцинируются от дифтерии и столбняка - только 74,6% регулярно и 7,9% реже чем 1 раз в десять лет; при этом наименее дисциплинированными оказались врачи из числа узких специалистов. Выявлено, что приверженность медицинских работников к вакцинации детей и собственной ревакцинации повышается с возрастом, зависит от региона и группы профессиональной деятельности, а также от факта прохождения специального обучения по организации иммунопрофилактики [27].

Опрос студентов выявил недостаточное знание Национального календаря профилактических прививок, а также многочисленные заблуждения в отношении профилактических прививок со стороны педиатров (особенно детских неврологов и детских аллергологов-иммунологов), осторожное отношение в вопросах вакцинации и доверие к «мифам» о прививках среди законных представителей пациентов [21].

Анкетирование медицинских работников Республики Татарстан с охватом 3250 человек выявило, что значительная часть (95 %) медицинских работников положительно относятся к вакцинопрофилактике, вакцинировались сами и вакцинировали своих детей. 89,9 % медицинских работников поддерживают инициативу об отмене права граждан на отказ от вакцинации. Основными составляющими успешной организации вакцинопрофилактики в медицинской организации, по мнению медицинских работников, служат доступность и разнообразие вакцин, уровень квалификации медицинского персонала и оснащение прививочного кабинета [28].

В основе успешной коммуникации лежит способность врача построить доверительный диалог, основанный на уверенности в доброжелательности всех его участников. Для сомневающимся пациентов врач является одним из наиболее значимых источников информации о прививках. Умение врача четко и уверенно построить диалог о вакцинации позволяет развеять сомнения пациента и является наиболее эффективным средством повышения приверженности населения иммунизации [29].

Исследованием Сенькевич с соавт, 2021 [23] установлен приоритет врача-педиатра в качестве источника информации о вакцинопрофилактике детей и высокий уровень доверия к государственным учреждениям здравоохранения в вопросах вакцинации. Выявлено в целом позитивное отношение к вакцинопрофилактике. Однако часть родителей, дети которых могут быть резервом увеличения прослойки своевременно вакцинированных детей, осознают важность вакцинации как защиты от инфекций, но обоснованно (по медицинским противопоказаниям) или необоснованно откладывают ее на неопределенный срок.

Заключение

Таким образом, на основе анализа источников литературы по вопросам причин отказов от вакцинации можно выделить следующие: отсутствие или недостаточная информированность населения, в том числе родителей; склонность верить «мифам» о вреде вакцинации; боязнь поствакцинальных реакций и осложнений; вера в отсутствие риска заражения инфекционными заболеваниями; доверие фейковой информации из интернета; приверженность к антивакцинным движениям в некоторых странах; использование нетрадиционных методов повышения иммунитета; недоверие вакцинам, произведенным в других странах. Отрицательное мнение медицинских работников о вакцинах, недостаточный уровень знаний узких специалистов по вопросам вакцинации, особенно среди неврологов, приводило к достаточно высокому уровню медицинских отводов у детей. Исследователями отмечено, что врачи не всегда владеют достаточными коммуникативными навыками для построения правильного диалога с родителями.

Согласно данным публикаций рекомендации работников здравоохранения включали такие мероприятия, как: 1) использование визуальных карточек с научными данными о составе вакцины и профилактике заболеваний для консультирования пациентов, 2) описание компонентов вакцины в доступной и наглядной форме, 3) освещение национального контроля качества и производства на упаковке вакцины и этикетках, 4) проведение интервью с лидерами общественного мнения, 5) подготовка ключевых лиц для работы с населением по вакцинами. Правительственные меры могут включать снижение налогов для родителей, чьи дети полностью вакцинированы.

Финансирование

Работа выполнена в рамках научного проекта «Влияние вакцинации на иммунитет у больных с состоянием после COVID 19 среди населения Казахстана» (ИРН AP14870878) на 2022–2024 годы финансируемого МНиВО РК.

Литература:

- 1 Исабек А.У., Бопи А.К., Ахмет Р.А., и др. Метод повышения эффективности получения рекомбинантных вирусов эффективности получения рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита для разработки векторных вакцин. *Микробиология и вирусология*, 2023, 2(41): 65-80 (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.04)
- 2 Намазова-Баранова Л.С., Федосеев М.В., Гринчик П.Р., и др. Привитость и охват иммунизацией в соответствии с национальным календарем профилактических прививок детского населения: одномоментное многоцентровое исследование. *Педиатрическая фармакология*. 2021;18(2):110-117 (DOI: 10.15690/pf.v18i2.2218)
- 3 Русакова Е.В., Семенов Т. А., Ноздрачева А. В., Русаков Н. В. Корь: проблемы на этапе элиминации. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2020. №3.52-59 (<https://izvestiya.ggtu.ru/journal-issue/>)
- 4 Задорожная В. И. Корь в Украине: необъявленная эпидемия. *Клиническая инфектология и паразитология*. 2019. Т.8, №2.150-157 (<https://elibrary.ru/item.asp?id=38518646>)
- 5 Жужжасарова А.А., Баешева Д.А., Турдалина Б.Р., и др. Показатель вакцинального статуса и заболеваемости корью в Республике Казахстан. *Наука и Здравоохранение*. 2021. 4(Т.23).155-162 (doi 10.34689/SH.2021.23.4.017)
- 6 Габасова М.К., Даниярова А. Б., Алкешева Л. Ж., и др. Эпидемиологическая ситуация по кори в Республике Казахстан по данным ретроспективного анализа. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2020. №1.388-393 (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskaya-situatsiya-po-kori-v-respublike-kazahstan-po-dannym-retrospektivnogo-analiza>)
- 7 Lyu H, Wang J, Wu W, et al. Social media study of public opinions on potential COVID-19 vaccines: informing dissent, disparities, and dissemination. *Intell Med*. 2022 Feb;2(1):1-12. (doi: 10.1016/j.imed.2021.08.001)
- 8 Ruoyan Sun, Henna Budhwani, Negative sentiments toward novel coronavirus (COVID-19) vaccines. *Vaccine*. 2022.; 40(48): 6895-6899. (doi: 10.1016/j.vaccine.2022.10.037)
- 9 Han Xu, Ruixin Liu, Ziling Luo, Minghua Xu. COVID-19 vaccine sensing: Sentiment analysis and subject distillation from twitter data. *Telematics and Informatics Reports*. 2022. 8:100016. (doi: 10.1016/j.teler.2022.100016)
- 10 Goktas, O., Can, F. E., Yakar, B., et al. Seasonal influenza vaccine awareness and factors affecting vaccination in Turkish Society. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2022.38(4). (doi: 10.12669/pjms.38.4.4915)
- 11 Łoś-Rycharska E, Popielarz M, Wolska J, et al. The antivaccination movement and the perspectives of Polish parents. *Pediatrics Polska - Polish Journal of Paediatrics*. 2022;97(3):183-192. (doi:10.5114/polp.2022.117913)
- 12 Atasever BN, Sayar S, Sabancı M, et al. Vaccine rejection for parents with babies of 0-24 months: Solution recommendations for causes and reduction. *J Pediatr Inf* 2021;15(2): 97-102 (DOI: 10.5578/ced.202119805)

- 13 Pisaniak P, Tarczon A, Konarska M, Ozga D. Parents' Opinions and Knowledge About Vaccination in Poland - A Cross-Sectional Observational Study. *Int J Gen Med.* 2021; 14:3235-3242 (doi: 10.2147/IJGM.S302699)
- 14 Cadeddu C, Daugbjerg S, Ricciardi W, Rosano A. Beliefs towards vaccination and trust in the scientific community in Italy. *Vaccine.* 2020 Sep 29;38(42):6609-6617 (doi: 10.1016/j.vaccine.2020.07.076)
- 15 Li Ping Wong, Pooi-Fong Wong, Megat Mohamad Amirul Amzar Megat Hashim et al. Multidimensional social and cultural norms influencing HPV vaccine hesitancy in Asia, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2020. 16:7, 1611-1622 (DOI: 10.1080/21645515.2020.1756670)
- 16 Yalçın, S.S., Bakacak, A.G. & Topaç, O. Unvaccinated children as community parasites in National Qualitative Study from Turkey. *BMC Public Health* 20, 2020.1087 (doi: 10.1186/s12889-020-09184-5)
- 17 Галицкая М.Г., Фисенко А.П., Таточенко В.К., и др. Вакцинопрофилактика и ее противники в современном мире. *Российский педиатрический журнал.* 2021; 24(6): 424–432 (doi: 10.46563/1560-9561-2021-24-6-424-432)
- 18 G. Pelčić, S. Karačić, Г. Л. Микиртичан и др. Религиозные возражения для вакцинации или религиозные оправдания для уклонения от вакцинации: действительно ли они существуют? *Медицина и организация здравоохранения.* 2020.Т.5,№1.С.58-78 (<https://ojs3.gpmu.org/index.php/medorg/article/view/2372>)
- 19 Моисеева К.Е., Алексеева А.В. Основные причины отказов от вакцинации. *Социальные аспекты здоровья населения [сетевое издание].* 2019; 65(5):9 (DOI: 10.21045/2071-5021-2019-65-5-9)
- 20 Пивоварова О.А., Кураева В.М. Международные аспекты антивакцинаторства: последствия для общественного здравоохранения (обзор литературы). *Здравоохранение Российской Федерации.* 2022;66(6):542-548 (doi: 10.47470/0044-197X-2022-66-6-542-548)
- 21 Калюжная Т.А., Федосеенко М.В., Намазова-Баранова Л.С., и др. Преодоление антипрививочного скепсиса: поиски решения выхода из сложившейся ситуации. *Педиатрическая фармакология.* 2018;15(2):141-148 (DOI: 10.15690/pf.v15i2.1871)
- 22 Ваняркина А.С., Петрова А.Г., Баянова Т.А., и др. Вакцинопрофилактика у детей: знания родителей или компетенция врача. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2019;(4):23-28 (DOI: 10.34215/1609-1175-2019-4-23-28)
- 23 Сенкевич О.А., Плотоненко З.А., Молочный В.П., Каплиева О.В. Социально-демографические характеристики семей, отказывающихся от вакцинации, и причины отказа. *Инфекция. болезни (инфекционные заболевания).* 2021; 19(1): 124-130 (DOI: 10.20953/1729-9225-2021-1-124-130)
- 24 AlpamysIssanov, ZylkiyaAkhmetzhanova, Dieter Riethmacher& Mohamad Aljofan. Knowledge, attitude, and practice toward COVID-19 vaccination in Kazakhstan: a cross-sectional study, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021. 17:10, 3394-3400 (doi: 10.1080/21645515.2021.1925054)
- 25 Laura Naranjo, Elidia Domínguez, Carlos Rodriguez, Reynaldo Chandler, et al. Adult immunization practices, challenges and opportunities in Central America and the Caribbean: Advisory board proceedings, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2022.18:7 (DOI: 10.1080/21645515.2022.2129236)
- 26 Галина Н. П. Отношение к иммунопрофилактике врачей различных специальностей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2018. Т. 17, № 3(100). 74-79 (DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-74-79.)
- 27 Бекетова Г.В., Булавинова Е.А., Децик О.З., и др. Приверженность медицинских работников к вакцинации. *Педиатрия. Восточная Европа.* 2021. Т. 9, № 2. 166-175 (DOI: 10.34883/PI.2021.9.2.002.)
- 28 Лопушов Д.В., Трифонов В.А., Имамов А.А., и др. Отношение медицинских работников к вакцинации на современном этапе. *Казанский медицинский журнал.* 2018. Т. 99. №5. 812-817 (doi: 10.17816/KMJ2018-812)
- 29 Ермоленко К.Д., Харит С.М., Рулева А.А., Дроздова Л.Ю. Построение диалога с пациентом о вакцинации (научный обзор). *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2021;20(1):114-124 (DOI: 10.31631/2073-3046-2021-20-1-114-124)

=====

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

=====

IRSTI:62.37.35; 68.41

A.K. AKHMETZHANOVA^{1*}, G.I. BAIGAZIEVA¹, A.K. KEKIBAEVA¹, L. HRYVNA²¹Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan²Mendel University, Brno, Czech Republic

*e-mail: aytowa@mail.ru

NEW YEAST STRAIN FOR BEER PRODUCTION**doi:10.53729/MV-AS.2023.04.07****Abstract**

To improve the properties of yeast used in brewing and winemaking, scientists have widely used the methods of classical genetics. The research is devoted to the focus of the work is on strains of brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, capable of fermenting beer wort most effectively and having no organoleptic deficiencies. The object of the study is 6 strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast from Federal State Unitary Enterprise «State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms» (<http://www.genetika.ru/vkpm>). The selected strains were crossed as a result of using a selective selection system for rare hybrid clones. Production tests of one of the clones of the resulting strain showed positive outcome. Using new yeast strain will solve three main tasks of brewing - to improve the consumer properties of the drink, the technological parameters of production and the stability of the finished product during storage. The versatility of the strain will allow the use of these yeasts in the production of other beers.

Keywords: yeast strain, beer wort, beer turbidity, ethyl alcohol, physico-chemical parameters.

Beer is an ancient, natural beverage that combines the power of grain malt and yeast vitality. Beer production's uniqueness stems from yeast fermenting the sugars in beer wort to produce alcohol and carbon dioxide.

Many grain components rely on complex organic and inorganic compounds to create the flavour and aroma of beer through intricate biochemical reactions.

Yeast is the main active ingredient in beer. Complete sequencing of the yeast genome has revealed about 6000 genes involved in the metabolism of this seemingly simple microorganism. Theoretically, the possible number of interactions between the products of these genes is much larger.

What are the fundamental requirements for microorganisms that influence brewing? Firstly, the beer must be flavourful. Therefore, the presence of substances that produce an unpleasant taste or aroma during fermentation should not exceed the consumer's perception threshold. There are over 800 known substances that can impact the taste and aroma of beer. Initially, these compounds include hydrogen sulfide, fatty and inorganic acids, higher alcohols, aldehydes, and basic esters [1].

Secondly, the efficient removal of maltose, the main sugar in beer wort, and a strong flocculation ability, among other factors. And also yeast should meet modern technological requirements. For instance, the adoption of high-density brewing technology has recently been implemented. This technology enhances the economic viability of the business by reducing energy consumption and making more intensive use of available equipment and auxiliary materials. By employing this modern technology, high-extract beer wort is diluted with sterile, deaerated water both before and after fermentation until the desired dry matter content is attained. However, during fermentation of high-density wort, yeasts experience osmotic stress, as a result of which their

activity changes (glycero-3-phosphate dehydrogenase is activated, synthesising glycerol to overcome the external hyperosmotic pressure on the yeast cell wall). And pyruvate is also synthesised, which negatively affects the flavour and aroma of the beer, and can be converted into fermentation by-products (higher alcohols and esters). When brewing high-density beer, substantial quantities of ethanol are generated, leading to an increased occurrence of dead cells and early yeast flocculation.

Thirdly, beer is not just a multi-component beverage; it also undergoes changes over time. Thanks to the use of new filtration technologies, it has become possible to significantly extend the shelf life of beer. Beer stability refers to its ability to maintain organoleptic characteristics for a certain period, and this can be achieved by enhancing its biological and colloidal stability.

Non-compliance with sanitary conditions of beer production leads to the appearance of extraneous microorganisms in beer, which adversely affects its quality. As mentioned above, beer is a complex colloidal system that maintains a delicate equilibrium. Disruptions to this equilibrium can result in turbidity or suspended solids in the beer. The colloidal balance undergoes disruption due to various reactions (such as oxidation, polymerization, interactions among beer components).

In brewing and winemaking, scientists frequently employ classical genetic methods such as mutagenesis, hybridization, cytoduction, and others to enhance yeast characteristics. Modern methods of genetics and molecular biology make it possible to target genes using genetic engineering methods and obtain organisms with predetermined properties. In practical applications, these methods are used to obtain yeast strains that do not produce compounds like diacetyl, dimethyl sulfide, hydrogen sulfide, and other substances known to cause defects in beer.

Numerous strains of *Saccharomyces cerevisiae* brewer's yeast are well-documented in the brewing industry, and a diverse range of these yeast strains is utilized across numerous countries.

The AD009 strain from the *Hefebank Weihenstephan* collection is among the most widely used in brewing due to its ability to process mono-, di-, and trisaccharides in the wort, ultimately producing ethanol. The strain is highly efficient in reducing diacetyl and pentanedione and has good flocculation properties. The disadvantage of this strain is the high content of sulfur and sulfur-organic compounds in the finished beer. Change of technological modes does not allow for improvement in organoleptic properties of the final product with effective reduction of sulfur compounds synthesis level.

In Kazakhstan, enterprises most often use yeast strains 11, 47, B, and 776 for fermentation at temperatures from 5 to 10°C. Other strains are also utilized, but less frequently. Race 776 was developed at the Fermentation Institute in Berlin. The strains Rh, 34, 34/70, 145, 129 and 308 are employed for the so-called warm fermentation technology, typically ranging from 7 to 15°C.

Materials and methods of research

This research focused on the cultivation of a yeast strain designed to drive innovation in the brewing industry. Recent developments in the food industry have spurred the creation of novel alcoholic and non-alcoholic products, necessitating updated criteria for brewer's yeast, a pivotal component in this intricate process.

At the beginning of the research, we utilized 6 yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Federal State Unitary Enterprise «State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms» (<http://www.genetika.ru/vkpm>) to select the most promising strains.

Comparative research of the fermentation activity of these 6 strains was carried out at 13°C in laboratory conditions in conical flasks with water closers, limiting the entry of oxygen and ensuring the removal of fermentation gases in a separate flask with water. Sterile standard beer wort, produced by JSC IP «Efes Kazakhstan» with a density of 12°, was used. The initial yeast concentration in the flask was 10 million cells per 1 ml. At the end of the fermentation process, the fermented wort was filtered through a double paper filter and a layer of diatomaceous earth on a double layer of filter paper to get rid of yeast cells. The real degree of fermentation (% RDF) and the volumetric percentage of ethanol formed (% alc V/V) were measured using an Anton

Paaralcoholizer . The sensory characteristics of the fermented wort, including its aroma and flavour, were subjected to organoleptic assessment [2].

The strains that could ferment beer wort most efficiently and had no organoleptic deficiencies (odour of organ sulphur compounds, diacetyl, phenolic odour, etc.) were selected.

The most promising strains studied in the «Educational and Scientific Centre for the Production of Fermentation Products» of Almaty Technological University, simulating production conditions in cylinder-conical tanks (CCT) with a volume of 50 l of 12° beer wort at 13 °C.

The prepared batch of wort was filled into two identical cylindrical conical tanks (CCT). One CCT received a culture of the production brewing strain, while the other was inoculated with a culture obtained under laboratory conditions. Starter cultures for both the control and experimental strains were concurrently prepared, following an identical procedure using the same beer wort. Analysing both tanks was at the same time [3].

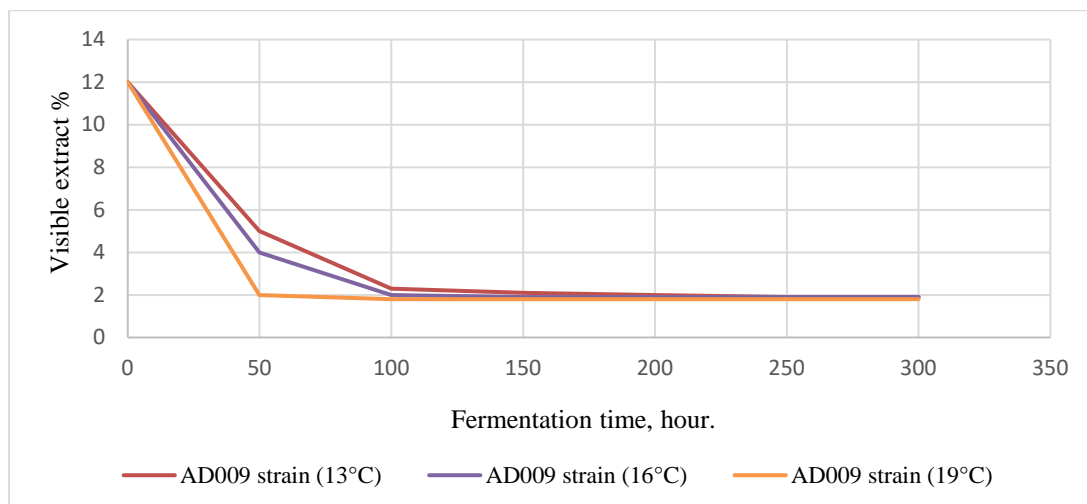
Results and discussion

Most of the tested strains exhibited multiple organoleptic defects, imparting a phenolic or sulfurous aroma to the fermented wort. Nonetheless, we succeeded in isolating strains that exhibited negligible production of phenolic compounds. The subsequent objective entailed the hybridization of these strains to generate progeny [4]. The hybridization process was feasible only through the utilization of a selective system for identifying rare hybrid clones on a minimal medium containing alcohol, where neither parent strain could proliferate. One of the resultant clones was employed for subsequent experiments [5].

The production trials of the new strain were successful. Figure 1 displays a graph illustrating the visible extract drop during fermentation using both the well-known and widely-used world strain

AD009 and our newly obtained strain J (Jana) at three different temperatures: 13°C, 16°C, and 19°C [6]. These characteristics reduce energy consumption during wort cooling in the CCT. The efficiency of primary and secondary fermentation, which includes beer maturation in the CCT and diacetyl reduction, directly relies on the physiological state of yeast and their sedimentation ability when high ethanol concentrations appear towards the end of fermentation. Modern high-density brewing technologies, widely adopted, impose new requirements on yeast behaviour during fermentation. Figure 2 illustrates the yeast cell concentrations of AD009 and J in the CCT throughout fermentation. Notably, yeast J appears more abundant in the CCT, suggesting reduced sedimentation capacity [7].

a



b

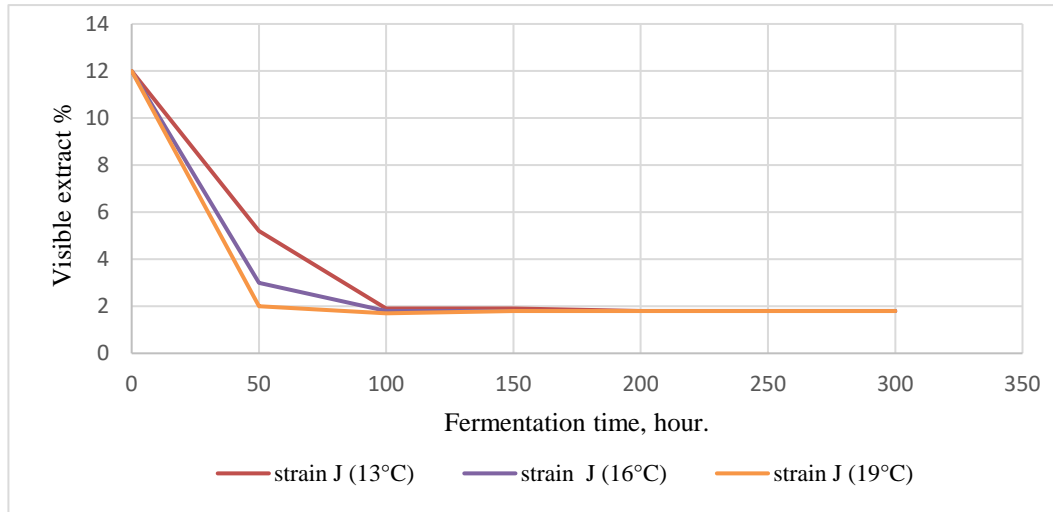
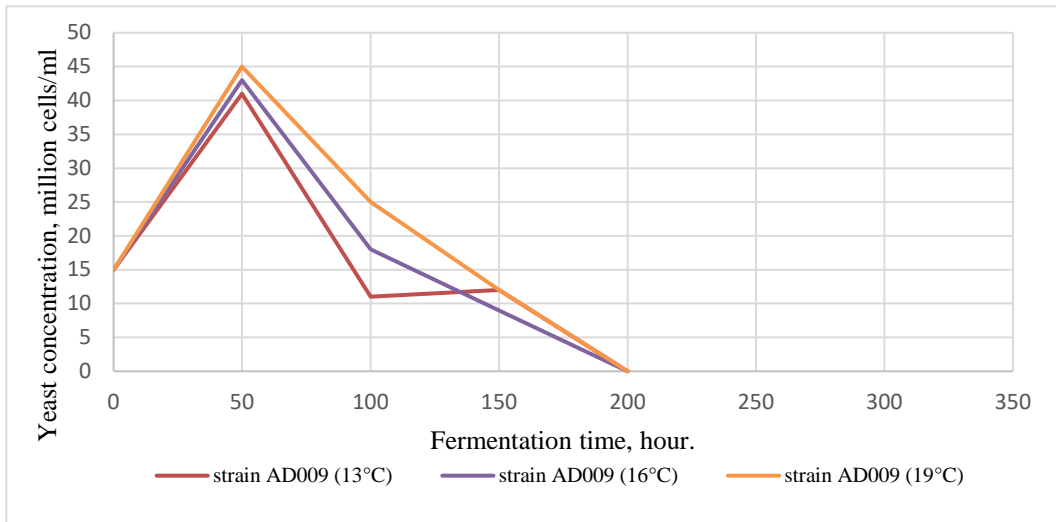


Figure 1 - Decrease in apparent extract during fermentation: a - strain AD009, b - strain J

a



b

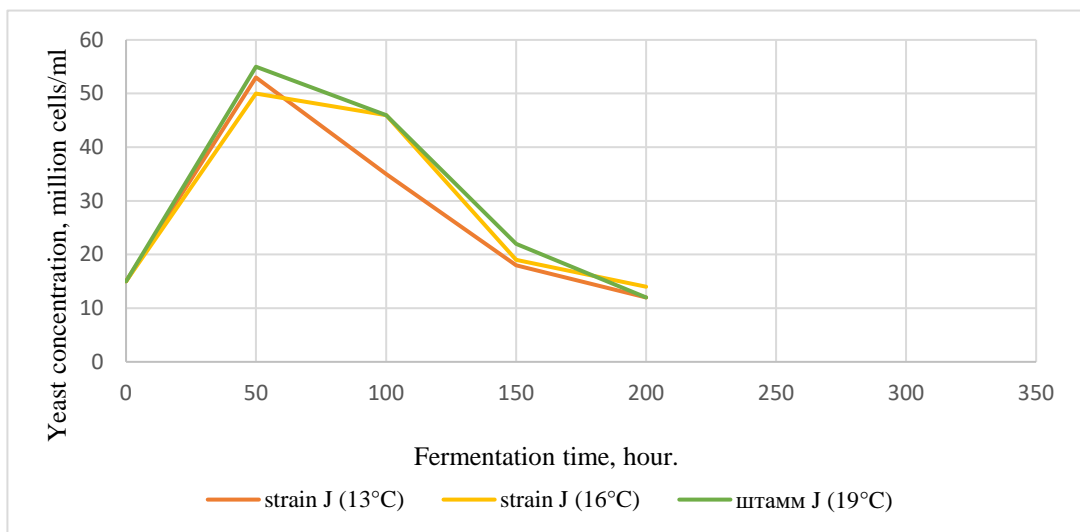


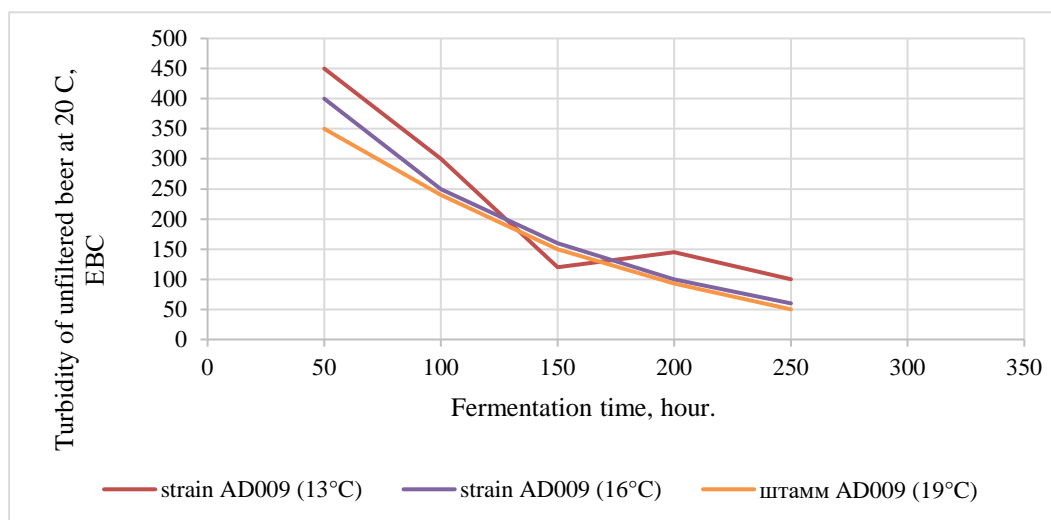
Figure 2- Concentration of yeast cells in CCT during fermentation: a - strain AD009, b - strain J

This property can be effectively harnessed within contemporary high-density brewing technologies to mitigate premature yeast flocculation, particularly at elevated ethanol concentrations.

In the present-day context of rapidly expanding beer volumes and extended shelf life, maintaining colloidal stability has become a pressing necessity. A significant proportion of the compounds in beer exist in a colloidal state. During beer storage, prolonged cooling, or heating, the physical and chemical equilibrium of colloidal complexes, which can precipitate, becomes disrupted. This leads to processes such as ageing, particle size growth, oxidation, polymerization, adsorption, the formation of insoluble high molecular weight polyphenols, protein degradation, and denaturation. The presence of numerous suspended particles in the solution contributes to its turbidity [8]. It can be quantified using turbidity meters, also known as turbidimeters. However, for enhanced sensitivity, precision, and applicability across a broad spectrum of particle sizes and concentrations, nephelometer offer an advantageous alternative. Nephelometers detect the scattering of light within a solution at either a 90° or 25° angle. Turbidity arises from the interplay between light and suspended particles in water. In a perfectly pure liquid, a light beam passing through remains essentially unaltered. However, even in pure water, individual molecules induce light scattering, albeit to a minimal extent and at a small angle [9]. As a consequence, no solution exhibits absolute zero turbidity. In the presence of suspended solid particles within the sample, the outcome of the sample's interaction with transmitted light is contingent upon several factors, including the size, shape, composition of the particles, and the wavelength (colour) of the incident light. Researching both the initial and induced turbidity of beer, it becomes feasible to anticipate the technological attributes of the filtration process and the shelf life of the product [10].

Figure 3 illustrates the turbidity profiles of unfiltered CCT beer derived from strain AD009 and the new strain at varying temperatures. Notably, lower turbidity values were observed for the new strain at 16°C. Turbidity levels exhibited an ascending trend as fermentation temperature increased up to 19°C, likely attributed to enhanced system agitation due to gas formation. Conversely, the reduction in process temperature to 13°C seemed to correlate with heightened particle adsorption on the yeast cell surfaces, resulting in increased turbidity [11,12].

a



b

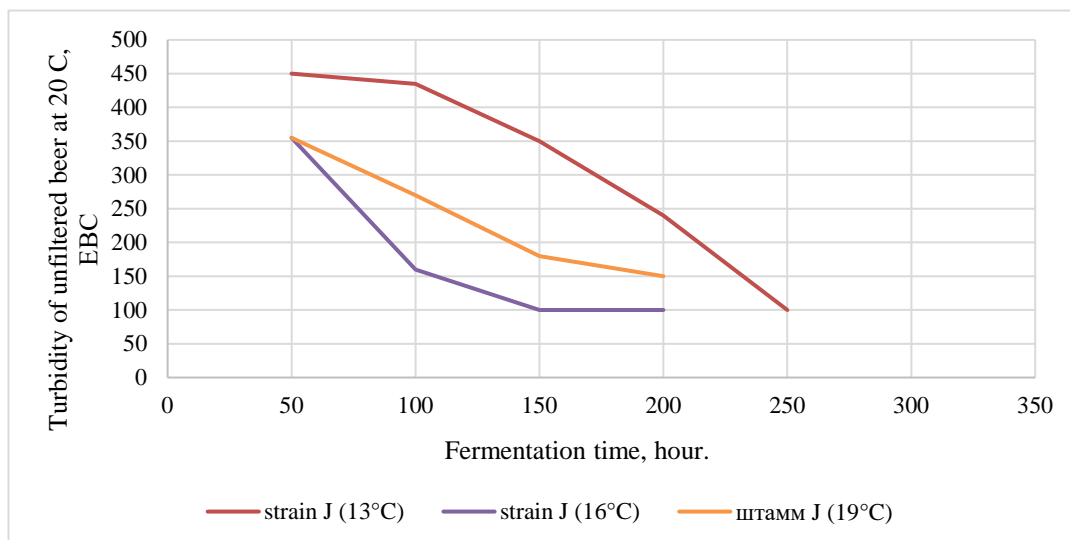


Figure 3 - Turbidity of unfiltered beer during fermentation: a - strain AD009, b – strain J

Conclusion

However, the main advantages of beer are its consumer properties - its unique flavour and aroma, and the absence of substances that negatively affect them. Thus, the beer obtained with the new strain had a unique bouquet with pleasant ethereal notes and a vanilla tinge. At the same time, organosulfur compounds were practically absent (Figure 4). Based on the new strain, a new beer brand was created. Thus, using only methods of classical genetics and selection, we managed to solve the problem of creating a new strain for a new type of beer. The main goal of the work was achieved - the most extensive screening of strains of different origins and subsequent selection for the traits of interest. The application of the new strain makes it possible to solve three main tasks of brewing - improvement of consumer properties of the beverage, technological parameters of production and stable storage of the finished product. The versatility of the strain made it possible to use this yeast in the production of other types of beer, cider and kvass.

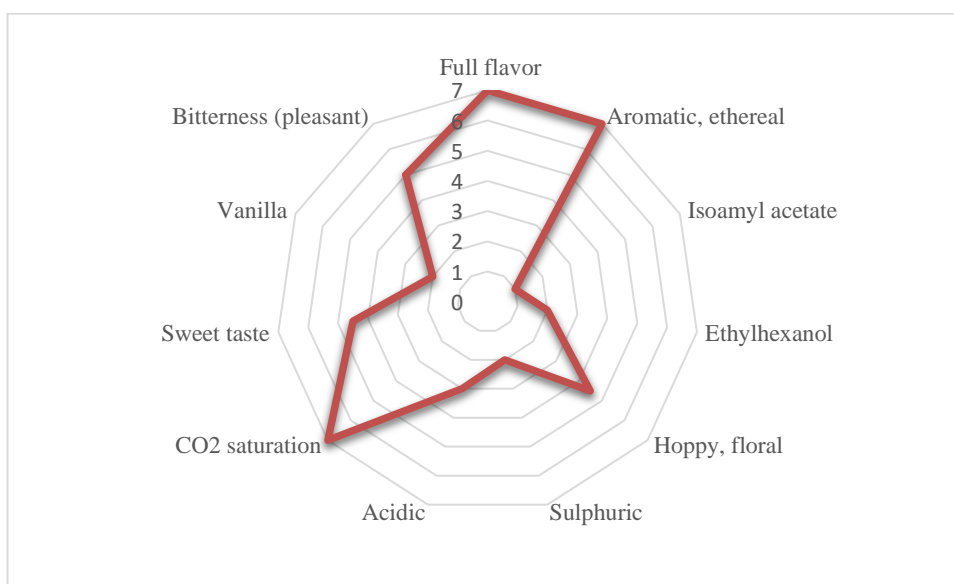


Figure 4 - Organoleptic profile of the produced new beer

References:

- 1 Il'ina Ye. V. Vliyaniye bezalkogol'nogopivanazdorov'yecheloveka *Pivo inapitki*, 2010,6: 48–49. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)
- 2 Ogannisyan V. G. Bezalkogol'noye pivo itekhnologiiye gopolucheniya *Pivo inapitki*, 2007,6:19–23. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)
- 3 Cherkasova Ye.S., Kamenskaya Ye.P. Seleksiya shtamma drozhzhey dlya prigotovleniya bezalkogol'nogo piva. *Materialy XXI Mezhdunar. nauchno-prakticheskoyakonf.* Barnaul: Izd-voAltGTU, 2020:177–180. (<http://elibrary.asu.ru/xmlui/handle/asu/81>)
- 4 Slavskaya I.L., Makarov S.YU., Il'inYe.V. Obzorynka bezalkogol'nogo piva *Pivo inapitki*, 2010,2: 4–6 s. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)
- 5 Balanov P.Ye. *Tekhnologiya fermentatsii*: M., 2013.
- 6 Akhmetzhanova A.K., Baygazyeva G.I. Podborrezhima zatiraniya dlya proizvodstva bezalkogol'nogo piva *II Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya v ramkakh mezhdunarodnogo nauchno-prakticheskogo foruma, posvyashchennogo dnyu khleba i soli* g.Saratov, 2021 g.:115-119. (<https://www.researchgate.net/publication/352019082>)
- 7 Akhmetzhanova A.K., ƏbítbekA.Ye. Sovremennyye tendentsii k proizvodstvu spetsial'nykh sortov piva s povyshennoy pishchevoy tsennost'yu v Kazakhstane. *Mat. Mezhd. nauch.-prakt. konf. Zernovaya otrasl': sostoyaniyei perspektivy razvitiya, posvyashchennaya 70-letiyu akademika natsional'noy akademii i nauk Respubliki Kazakhstan Iztayeva Auyelbeka Iztayevicha* 28. g. Almaty, 2020 g.:158-160. (<https://distance.atu.kz>)
- 8 Meledina T.V., LebedevaYe.P. Tekhnologicheskii podkhod k regulirovaniyu sensorного profilya piva *Industriya napitkov*. -2004,4:10–14. (<https://beverage-industry.ru>)
- 9 Müller M. *Physical Methods of Dealcoholization of Beverage Matrices and Their Impact on Quality Attributes* / M.Müller [et al.] // *ChemBioEng Rev.* - 2017:310–326(doi: 10.1002/cben. 201700010)
- 10 Bellut K. *Application of Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer* / K. Bellut [et al.] // *Fermentation*. – 2018:1–19 (doi: 10.3390/fermentation4030066)
- 11 Mangindaan D. Beverage dealcoholization processes: *Past, present, and future. Review* / D. Mangindaan, K.Khoiruddin, I.G.Wenten // *Trends in Food Science & Technology*. – 2018:36–45 (doi: 10.1016/j.tifs.2017.10.018)
- 12 Kobelev K.V. Metody polucheniya bezalkogol'nogo i slaboalkogol'nogo piva. V sb.: *Pivo i napitki*. 2020.№2:24–30. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)

А.К. АХМЕТЖАНОВА^{1*}, Г.И. БАЙГАЗИЕВА¹, А.К. КЕКИБАЕВА¹, Л. ГРИВНА²

¹Алматинский Технологический Университет, Алматы, Казахстан

²Университет Менделя, Брно, Чехия

*e-mail: aytowa@mail.ru

НОВЫЙ ШТАММ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПИВА

Аннотация

Для улучшения свойств дрожжей, применяемых в пивоварении и виноделии, ученые широко использовали методы классической генетики. Работа посвящена подбору штаммов пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способных наиболее эффективно сбраживать пивное сусло и не имеющих органолептических недостатков. Объект исследования - 6 штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИГенетика (ВКПМ) (<http://www.genetika.ru/vkpm>). Из подобранных штаммов осуществили скрещивание в результате применения селективной системы отбора редких гибридных клонов. Производственные испытания одного из клонов полученного штамма показали хорошие результаты. Применение нового штамма позволит решить три основные задачи пивоварения - улучшить потребительские свойства напитка, технологические параметры производства и стабильность готового продукта при хранении. Универсальность штамма позволит использовать эти дрожжи при производстве разных сортов пива.

Ключевые слова: штамм, дрожжи, пивное сусло, мутность пива, этиловый спирт, физико-химические показатели.

FTAMP:62.37.35; 68.41

А.К. АХМЕТЖАНОВА^{1*}, Г.И. БАЙГАЗИЕВА¹, А.К. КЕКИБАЕВА¹, Л. ГРИВНА²¹Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан²Мендель университеті, Брно, Чехия

*e-mail: aytowa@mail.ru

СЫРА ӨНДІРУГЕ АРНАЛҒАН ЖАҢА АШЫТҚЫ ШТАММЫ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.07

Түйін

Сыра қайнату мен шарап жасауда қолданылатын ашытқының қасиеттерін жақсарту үшін ғалымдар классикалық генетика әдістерін кеңінен қолданады. Жұмыс *Saccharomyces cerevisiae* сыра ашытқысының штаммдарын таңдауға арналған, ол сыра суслосын тиімді ашытуға қабілетті және органолептикалық кемшіліктері жоқ. Зерттеу нысаны - «Өндірістік микроорганизмдердің генетикасы және селекциясы мемлекеттік ғылыми-зерттеу институты» Федералдық мемлекеттік унитарлық кәсіпорны (ӨМБК). Бүкілресейлік коллекциясынан *Saccharomyces cerevisiae* ашытқысының 6 штамм алынды. Тандалған штаммдардың ішінен сирек кездесетін гибриді клондарды іріктеудің селективті жүйесін қолдану нәтижесінде будандастыру жүргізілді. Алынған штамм клондарының бірінің өндірістік сынақтары жақсы нәтиже көрсетті. Жаңа штаммды қолдану сыра қайнатудың үш негізгі міндетін шешуге мүмкіндік береді: сусынның тұтынушылық қасиеттерін, өндірістің технологиялық параметрлерін және сақтау кезінде дайын өнімнің тұрақтылығын жақсарту. Штаммның әмбебаптығы бұл ашытқыны басқа сыра өндірісінде қолдануға мүмкіндік береді.

Кілтгі сөздер: ашытқы штаммдары, сыра суслосы, сыра бұлыңғырлығы, этил спирті, физико-химиялық көрсеткіштер.

Сыра - астық уытының күші мен ашытқының өмірлік энергиясын сіңірген, ертеден келе жатқан табиғи сусын. Сыра өндірісінің бірегейлігі спиртпен көмірқышқыл газын қалыптастыру үшін сыра суслосының қанттарын ашытқымен ашыту процесін қолданумен байланысты.

Дегенмен, бәрі оңай емес. Астықтың құрамына кіретін заттардың көп мөлшері ашытқы метаболизмінің күрделі биохимиялық реакцияларының әсерінен сыранның дәмі мен хош иісін қалыптастыратын күрделі органикалық және бейорганикалық заттарға байланысты болады.

Ашытқы - сыранның негізгі белсенді компоненті. Ашытқы геномының толық реттілігі қарапайым болып көрінетін микроорганизмнің метаболизміне қатысатын шамамен 6000 генді анықтады. Бұл гендердің өнімдерінің өзара әрекеттесуінің теориялық мүмкін болатын саны әлдеқайда көп.

Сыра дайындауға әсер ететін микроағзаларға қойылатын негізгі талаптар қандай? Біріншіден, сыра дәмді болуы керек. Демек, соңғы өнімде ашыту нәтижесінде сыранның жағымсыз дәмін немесе хош иісін анықтайтын заттар тұтынушының сезім шегінен аспауы керек. Сыранның дәмі мен хош иісіне әсер ететін 800-ден астам зат белгілі. Бұларға ең алдымен күкіртсутек, май және бейорганикалық қышқылдар, жоғарыспирттер, альдегидтер, эфирлер жатады [1].

Екіншіден, әдеттегі талаптардан басқа, сыра суслосының негізгі қанты - мальтозаны тиімді жою, жақсы флокуляциялық қабілеті және т.б., сонымен қатар ашытқы заманауи технологиялардың талаптарын қанағаттандыруы керек. Мәселен, энергия шығыны азайтылған және қолда бар жабдықтар мен қосалқы материалдарды неғұрлым қарқынды пайдалану арқылы кәсіпорынның экономикалық тиімділігін арттыруға мүмкіндік беретін жоғары тығыздықтағы сыра қайнату технологиясы соңғы уақытта қолданысқа ие. Осы заманауи технологияны қолдану кезінде жоғары экстрактивтіліктегі сыра суслосын

стерильді ауасыздандырылған сумен ашытуға дейін және ашытудан кейінде жоспарланған құрғақ зат мөлшеріне жеткенге дейін сұйылтады. Алайда, тығыз суслоны ашыту кезінде ашытқы осмостық күйзелісті бастан кешіреді, нәтижесінде олардың белсенділігі өзгереді (ашытқы жасушаларының қабырғасына сыртқы гиперосмотикалық қысымды жеңу үшін глицеринді синтездейтін глицеро-3-фосфатдегидрогеназа белсендіріледі), сонымен қатар пируват синтезделеді, ол сыраның дәмі мен хош иісіне теріс әсер ететін көптеген ашыту жанама өнімдеріне (жоғары спирттер мен эфирлерге) айнала алады. Жоғары тығыздықтағы сыра қайнату кезінде этанолдың жоғары мөлшері қалыптасады, бұл өлі жасушалар санының артуы мен ашытқылардың ерте флокуляциясына алып келеді.

Үшіншіден, сыра тек көп компонентті ғана емес, сонымен қатар уақыт бойынша өзгертін сусын. Сыраны сүзудің жаңа технологияларын қолдануға байланысты бұл өнімнің сақтау мерзімін едәуір арттыруға мүмкіндік пайда болды. Сыраның тұрақтылығы-белгілі бір уақыт ішінде органолептикалық көрсеткіштерін сақтау мүмкіндігі болып табылады. Сыраның дәм тұрақтылығын қамтамасыз ету, оның биологиялық және коллоидтық беріктігін арттыру арқылы ғана мүмкін болады. Өндірістің санитарлық жағдайының жоғары деңгейін сақтамау сырада бөгде микроорганизмдердің пайда болуына әкеледі, ал ол оның сапасына теріс әсер етеді. Жоғарыда айтылғандай, сыра - бұл белгілі бір тепе-теңдікте болатын күрделі коллоидтық жүйе, бұзылған кезде сырада бұлыңғырлық немесе жүзгіндер пайда болады. Коллоидтық тепе-теңдіктің бұзылуы әртүрлі реакциялар нәтижесінде пайда болады (тотығу, полимерлеу, сыра компоненттерінің бір-бірімен әрекеттесуі және т.б.).

Сыра қайнату мен шарап жасауда ғалымдар ашытқы қасиеттерін жақсарту үшін, классикалық генетика әдістерін (мутагенез, будандастыру, цитодукция және т.б.) кеңінен қолданды. Генетиканың қазіргі әдістерімен молекулалық биология, гендік инженерия әдістерін қолдана отырып, гендерді мақсатты түрде өзгертуге және алдын ала анықталған қасиеттері бар ағзаларды алуға мүмкіндік береді. Іс жүзінде диацетил, диметилсульфид, күкіртсутек және сыраның ақауларын тудыратын басқа заттарды шығармайтын ашытқылар алынады.

Сыра қайнатуда *Saccharomyces cerevisiae* сыра ашытқысының көптеген штаммдары белгілі. Көптеген елдерде сыра ашытқыларының үлкен жинақтамасы қолданылады.

Сыра қайнату өндірісінде *Hefebank Weighnstephan* топтамасынан AD009 штаммын кеңінен қолданады. Ол сыра суслосындағы моно-, ди- және трисахаридтерін пайдаланып, этил спиртін түзу мүмкіндігіне ие. Штамм диацетил мен пентандионды азайтудың жоғары қабілеті мен жақсы флокуляциялық қасиеттерге ие. Бұл штаммның кемшілігі – осы штамм көмегімен алынған сыраның құрамындағы күкірт пен күкіртті органикалық қосылыстардың жоғары болуы болып табылады. Технологиялық режимдерді өзгерту күкірт қосылыстарының синтезінің деңгейін тиімді төмендетумен соңғы өнімнің органолептикалық қасиеттерін жақсартып алмайды.

Қазақстандық кәсіпорындарда суық (5...10°C) ашытуда 11, 47, V, 776 ашытқы расаларын қолданады. Басқа расаларда қолданылады, бірақ жиі емес. 776 расасы Берлин ашыту институтында сұрыпталған. Жылы ашыту (7...15 °C) технологиясы үшін Rh, 34, 34/70, 145, 129, 308 расалары қолданылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Біздің жұмысымыздың мақсаты - сыра қайнатудағы инновациялар үшін штамм жасау, өйткені бұл сала тағам өндірісінде соңғы уақытта жаңа алкогольді және алкогольсіз өнімдерді жасауда белсенді дамуда, ал бұл күрделі процестің негізгі қатысушысы - сыра ашытқысы болып табылады.

Жұмыстың басында біз ең перспективалы штаммдарды таңдау үшін Өндірістік микроорганизмдердің генетикасы және селекциясы мемлекеттік ғылыми-зерттеу институты» Федералдық мемлекеттік унитарлық кәсіпорны (ӨМБК) өнеркәсіптік

микроорганизмдерінің Бүкілресейлік коллекциясынан *Saccharomyces cerevisiae* ашытқысының 6 штаммын қолдандық (<http://www.genetika.ru/vkpm>).

Осы 6 штаммның ашыту белсенділігін салыстырмалы зерттеу зертханалық жағдайда 13°C температурада оттегінің түсуін шектейтін және ашыту газдарын сумен бөлек қолбаға шығаруды қамтамасыз ететін су жаптырығы бар конустық қолбаларда жүргізілді. АО ИП «Эфес Қазақстан» сыра қайнату зауытынан алынған тығыздығы 12° болатын стрерильді стандартты сыра суслосын қолданылды. Қолбадағы ашытқының бастапқы концентрациясы 1 мл-де 10 миллион жасушаны құрады. Ашыту процесі аяқталғаннан кейін ашытылған суслоны ашытқы жасушаларынан босату үшін қос қағаз сүзгісі және кизельгур қабаты сүзгі қағазының қос қабатында сүзу жүргізілді. Нақты ашыту дәрежесін (%RDF), түзілген этанолдың көлемдік пайызын (%alc V/V) өлшеу Anton Paar фирмасының алколайзері көмегімен жүргізілді. Органолептикалық көрсеткіштеріне ашытылған суслоның иісі мен дәмі бағаланды [2].

Сыра суслосын тиімді ашытуға қабілетті және органолептикалық кемшіліктері жоқ (күкірт органикалық қосылыстардың иісі, диацетил, фенолдық иіс және т.б.) штаммдарды іріктеу жүргізілді.

Ең перспективалы штаммдар Алматы технологиялық университетінде «Ашыту өнімдерінің оқу-ғылыми орталығы» 13°C температурада 50 л 12°C сыра суслосы бар цилиндр-конустық танктерде (ЦКТ) өндіріс жағдайларын модельдеу арқылы зерттелді. Сусланың партиясы дайындалды, екі бірдей цилиндр-конустық танкке (ЦКТ) бірдей көлемде толтырылды. Өндірістік сыра қайнату штаммының мәдениетін бақылау ЦКТ-не енгізілді, бір уақытта екінші ЦКТ-ға зертханалық жағдайда алынған штаммын дақыл егілді. Бақылау және эксперименттік штаммның бастапқы дақылдары бір уақытта бірыңғай сызба бойынша бірдей сыра суслосында дайындалды. Бақылау және эксперименттік танктерді талдау үшін сынама алу бір уақытта жүргізілді [3].

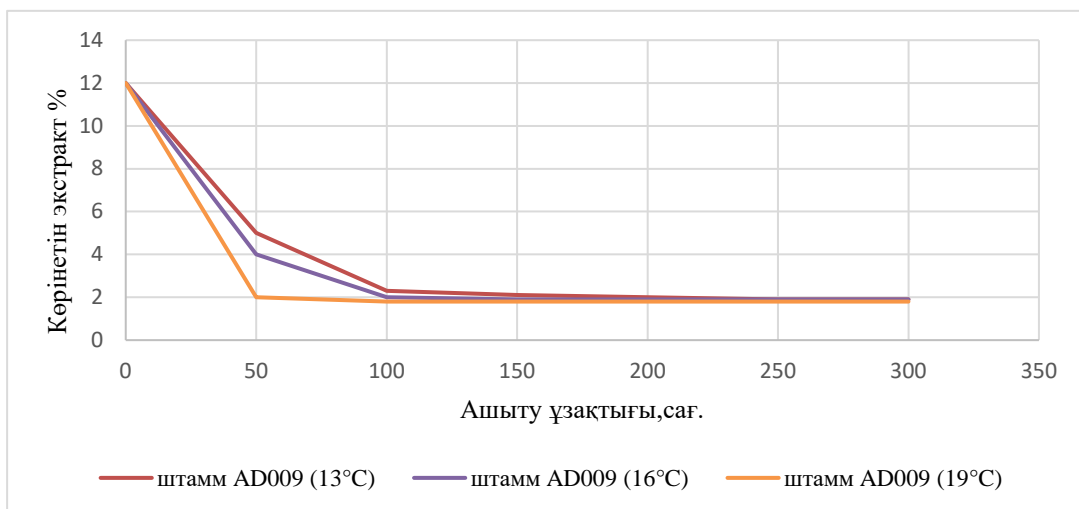
Нәтижелер және оларды талдау

Тексерілген штаммдардың көпшілігінде бірқатар органолептикалық ақаулар болды: олар ашытылған суслоға фенолды немесе күкіртті иіс берді. Алайда, біз фенолдық қосылыстардың айтарлықтай мөлшерін құрмайтын штаммдарды таңдай алдық. Келесі кезекте осы штаммдарды будандастырып, ұрпақ алу міндеті тұрды. Будандастыру тек ата-аналардың екеуі де өсе алмайтын алкогольмен минималды ортада сирек кездесетін гибриді клондарды таңдаудың селективті жүйесін қолдану нәтижесінде жүзеге асырылды. Алынған клондардың бірі кейінгі жұмыста қолданылды. Клонның фенотиптік сипаттамалары оның гибриді шығу тегін растады. Клон жоғары температураға және ортадағы мыс иондарының жоғары деңгейіне төзімділік белгісімен тұқым қуалады [4]. Сонымен қатар, микроскопия кезінде клондық жасушалар ата-аналық штамм жасушаларына қарағанда айтарлықтай үлкен болды. Шамасы, заңсыз будандастыру нәтижесінде алынған штаммда хромосомалардың кем дегенде үш есе жиынтығы бар. Жаңа штаммның кариотипін ата-анасының кариотиптерімен салыстырған кезде, бұл штаммның гибриді шығу тегі туралы қорытынды жасауға болады, өйткені оның ата-анасының екеуінде де полиморфты хромосомалары бар [5].

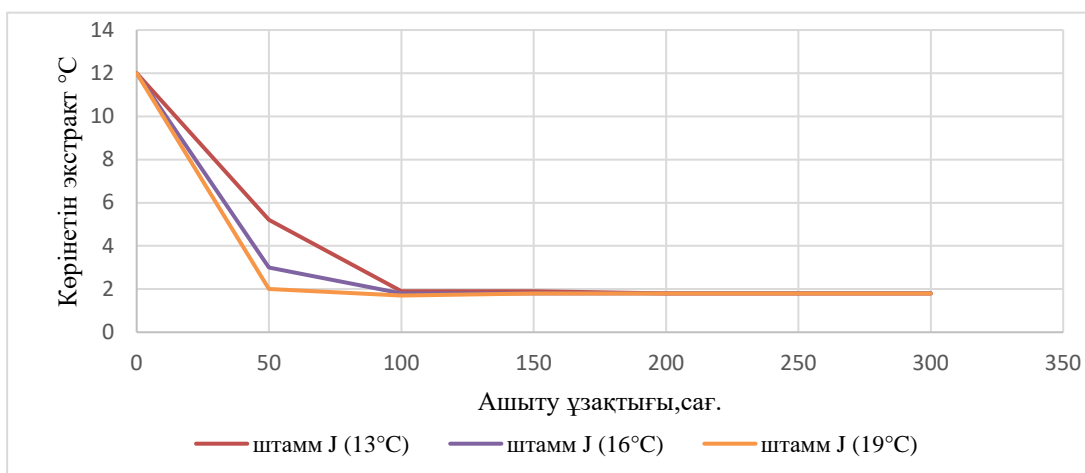
Жаңа штаммның өндірістік сынақтары сәтті өтті. Сурет 1-де әлемде белгілі және кеңінен қолданылатын AD009 штаммын және біз алған жаңа J (Jana) штаммын үш температурада: 13, 16 және 19°C пайдаланып ашыту кезінде көрінетін экстрактің түсу кестесін ұсынылды. Жаңа штаммның сусло экстрактісін жоғары температурада, яғни 16 және 19°C тезірек жоятындығы байқалады [6]. Бұл қасиетті ЦКТ-да суслоны салқындату кезінде энергия шығынын азайту үшін пайдалануға болады. Негізгі және қайталама (ЦКТ-де сыраның жетілуі, диацетилдің азаюы) ашытудың тиімділігі ашытқының физиологиялық жағдайына және этанолдың жоғары концентрациясы пайда болған кезде ашыту соңында олардың флокуляция (тұндыру) қабілетіне тікелей байланысты. Кеңінен қолданылатын заманауи жоғары тығыздықтағы сыра қайнату технологиялары ашыту кезінде ашытқының

әрекетіне жаңа талаптар қояды. Сурет 2-де AD009 пен Жашытқы жасушаларының концентрациясы ЦКТ-де ашыту кезінде көрсетілген. Ашытқы J көп мөлшерде ЦКТ-де екені көрініп тұр, бұл олардың тұндыру қабілетінің төмендегенін көрсетеді [7].

a

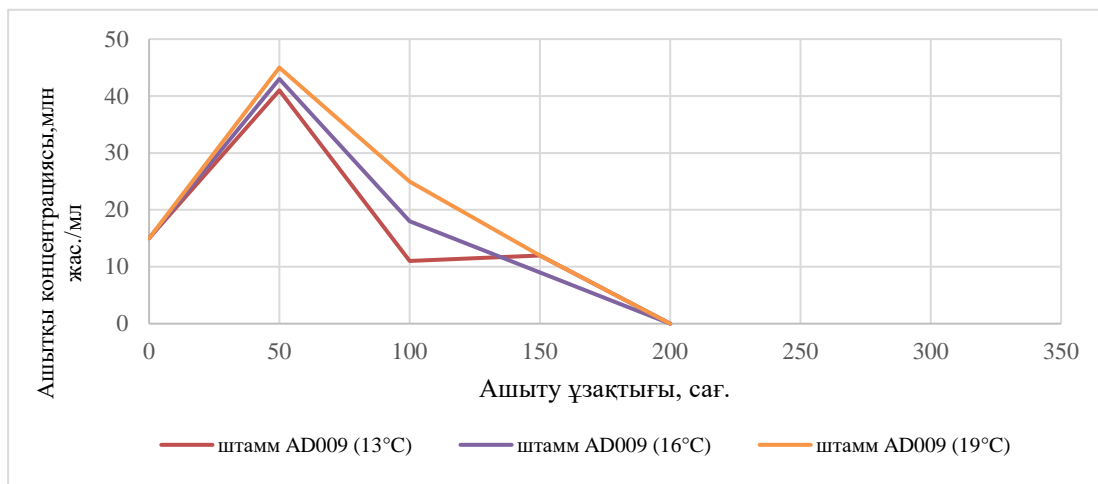


b

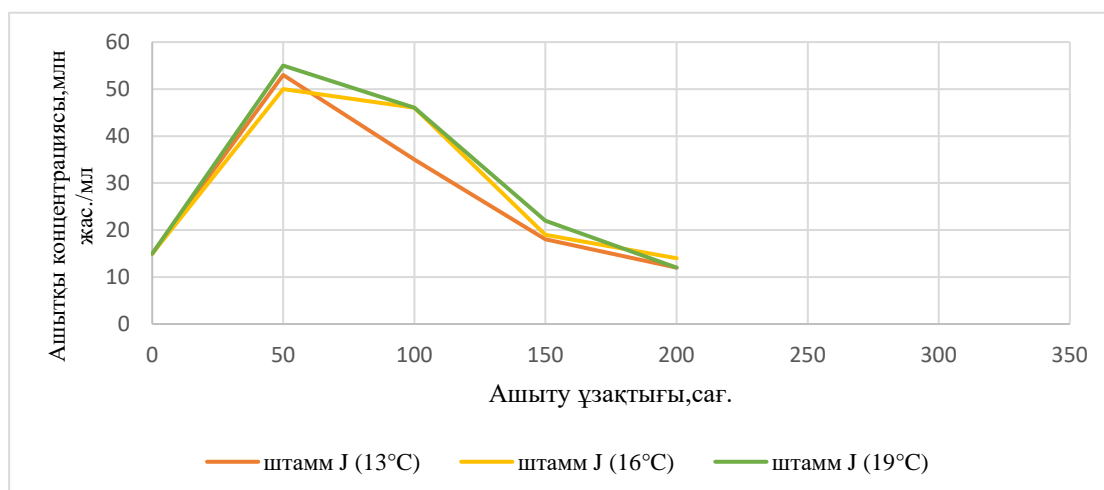


Сурет 1 - Ашыту кезіндегі көрінетін экстракттың төмендеуі: а - штамм AD009, б –штамм J

a



b



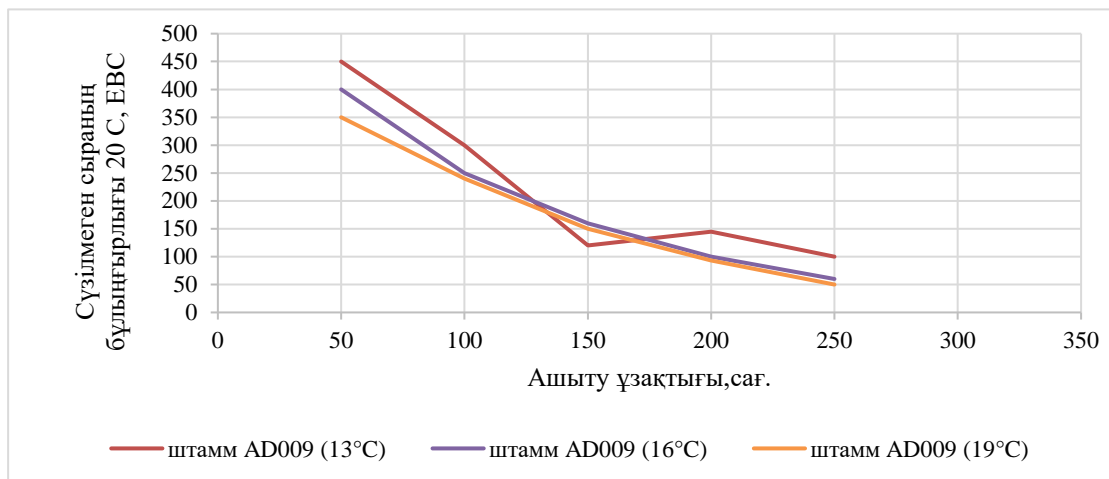
Сурет 2 - Ашыту кезінде ашытқы жасушаларының ЦҚТ-дағы концентрациясы:
a - штамм AD009, b – штамм J

Бұл қасиет этанолдың жоғары концентрациясында ашытқының ерте флокуляциясын болдырмау үшін заманауи жоғары тығыздықтағы сыра қайнату технологияларын қолдануда сәтті қолданылуы мүмкін.

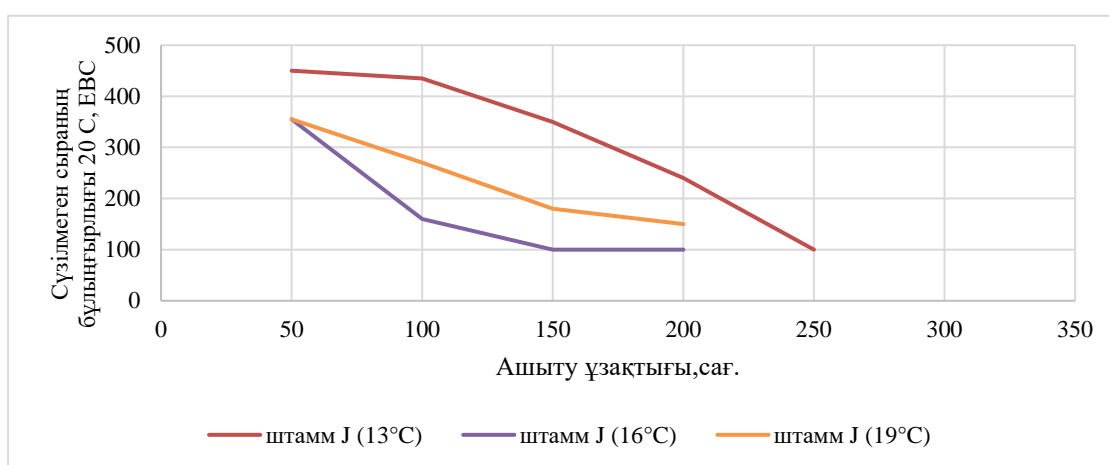
Сыраның көлемі мен сақтау мерзімінің күрт ұлғаюының қазіргі жағдайында коллоидтық тұрақтылық міндеті кезек күттірмейтін қажеттілік болып табылады. Сыраның құрамындағы заттардың көпшілігі коллоидты күйде болады. Оны ұзақ сақтау, салқындату немесе қыздыру кезінде тұнбаға түсетін коллоидты кешендердің физика-химиялық тепе-теңдігі бұзылады. Қартаю, бөлшектердің мөлшерінің ұлғаюы, тотығу, полимерлену, адсорбция, ерімейтін жоғары молекулалық полифенолдардың түзілуі, белоктардың ыдырауы және денатурациясы жүреді. Ерітіндіде көптеген ілінген бөлшектердің болуы оның бұлыңғырлығын тудырады [8]. Оны турбидиметрлер – бұлыңғыр өлшеуіш арқылы тіркеуге болады. Дегенмен, неғұрлым сезімтал, дәл және 90° немесе 25° бұрышта ерітіндідегі жарықтың шашырауын анықтайтын нефелометрлер бөлшектердің өлшемдері мен концентрацияларының кең ауқымында қолданылады. Осылайша, бұлыңғырлық суда ілінген жарық пен бөлшектердің өзара әрекеттесуінің нәтижесі болып табылады. Абсолютті таза сұйықтық арқылы өтетін жарық шоғы іс жүзінде өзгеріссіз қалады, дегенмен тіпті абсолютті таза судың өзінде молекулалар жарықтың өте кішкентай болса да, кейбір бұрышпен шашырауын тудырады [9]. Нәтижесінде ешбір ерітіндіде нөлдік бұлыңғырлық болмайды. Егер үлгіде қалқымалы қатты бөлшектер болса, онда үлгінің өтетін жарықпен әрекеттесу нәтижесі өлшеміне, пішініне және бөлшектердің құрамына, сондай-ақ түскен жарықтың толқын ұзындығына (түсіне) байланысты болады. Сыраның бастапқы және индукциялық бұлыңғырлығын зерттеу негізінде сүзу процесінің технологиялық сипаттамаларын және өнімнің жарамдылық мерзімін болжауға болады [10].

Сурет 3-те ЦҚТ-да AD009 штамы мен жаңа штамм көмегімен алынған, сүзілмеген сыраның түрлі температурадағы бұлыңғырлық сипаттамасы көрсетілген. Жаңа штамм үшін төмен бұлыңғырлық мәндері 16°C температурада байқалды. Ашыту температурасын 19°C-қа дейін жоғарылаумен бұлыңғырлық та жоғарылады, бұл шамасы, газ түзілуіне байланысты жүйенің неғұрлым қарқынды араласуына байланысты болды. Процесс температурасының 13°C-қа дейін төмендеуі кезінде бұлыңғырлануы жоғарылауы ашытқы жасушаларының бетіндегі бөлшектердің аз қарқынды адсорбциясымен түсіндіріледі [11,12].

a



b



Сурет 3 - Ашыту кезінде сүзілмеген сыраның бұлыңғырлығы: а - штамм AD009, б – штамм J

Қорытынды

Дегенмен, сыраның негізгі артықшылығы оның тұтынушылық қасиеттері - ерекше дәм мен хош иіс, оларға теріс әсер ететін заттардың болмауы. Осылайша, жаңа штамм көмегімен алынған сыра, жағымды эфирлік ноталары мен ванильдің иісі бар ерекше дәм-иісі болды. Сонымен қатар күкіртті органикалық қосылыстар іс жүзінде жоқ болды (сурет-4). Жаңа штамм негізінде сыра өнімі құрылды. Осылайша, тек классикалық генетика мен селекция әдістерін қолдана отырып, біз жаңа сыра өнімі үшін жаңа штамм шығару мәселесін шеше алдық. Жұмыстың негізгі мақсатына қол жеткізілді - әр түрлі шығу тегі штамдарын барынша кеңейтілген скрининг және қызығушылық белгілеріне сәйкес кейіннен іріктелінді. Жаңа штаммды қолдану сыра қайнатудың үш негізгі мәселесін - сусынның тұтынушылық қасиеттерін, өндірістің технологиялық параметрлерін және дайын өнімді тұрақты сақтауды жақсартуды шешуге мүмкіндік береді. Штамның әмбебаптығы бұл ашытқымен сыраның, сидрдің және квастың басқа түрлерін өндіруде қолдануға мүмкіндік берді.



Сурет 4 - Алынған жаңа сыраның органолептикалық профілі

Әдебиеттер:

- 1 Ильина Е.В. Влияние безалкогольного пива на здоровье человека *Пиво и напитки*, 2010,6: 48–49. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)
- 2 Оганнисян В. Г. Безалкогольное пиво и технологии его получения. *Пиво и напитки*, 2007,6:19–23. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)
- 3 Черкасова Е.С., Каменская Е.П. Селекция штамма дрожжей для приготовления безалкогольного пива. *Материалы XXI Междунар. научно-практической конф.* Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2020:177–180. (<http://elibrary.asu.ru/xmlui/handle/asu/81>)
- 4 Славская И.Л., Макаров С.Ю., Ильин Е.В. Обзор рынка безалкогольного пива *Пиво и напитки*, 2010,2: 4–6 с. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)
- 5 Баланов П.Е. *Технология ферментации*: М., 2013.
- 6 Ахметжанова А.К., Байгазиева Г.И. Подбор режима затириания для производства безалкогольного пива *II Международная научно-практическая конференция в рамках международного научно-практического форума, посвященного дню хлеба и соли* г.Саратов, 2021 г.:115-119. (<https://www.researchgate.net/publication/352019082>)
- 7 Ахметжанова А.К., Әбітбек А.Е.Современные тенденции к производству специальных сортов пива с повышенной пищевой ценностью в Казахстане. *Мат. Межд. науч.-практ. конф. Зерновая отрасль: состояние и перспективы развития, посвященная 70-летию академика национальной академии наук Республики Казахстан Изтаева Ауелбека Изтаевича 28. г.* Алматы, 2020 г.:158-160. (<https://distance.atu.kz>)
- 8 Меледина Т.В., Лебедева Е.П. Технологический подход к регулированию сенсорного профиля пива *Индустрия напитков*. -2004, 4:10–14. (<https://beverage-industry.ru>)
- 9 Müller M. *Physical Methods of Dealcoholization of Beverage Matrices and Their Impact on Quality Attributes* / M.Müller, [et al.] // *ChemBioEng Rev.* - 2017:310–326(doi: 10.1002/cben. 201700010)
- 10 Bellut K. *Application of Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer* / K. Bellut [et al.] // *Fermentation*. – 2018:1–19 (doi: 10.3390/fermentation4030066).
- 11 Mangindaan D. Beverage dealcoholization processes: *Past, present, and future. Review* / D. Mangindaan, K.Khoiruddin, I.G.Wenten // *Trends in Food Science & Technology*. – 2018:36–45 (doi: 10.1016/j.tifs.2017.10.018)
- 12 Кобелев К.В. Методы получения безалкогольного и слабоалкогольного пива. В сб.: *Пиво и напитки*. 2020.№2:24–30. (<https://foodprom.ru/pivo-i-napitki>)

IRSTI: 34.27.19

A.G. NOGAIBAEVA¹, K. MAKHMADEN^{2*}, Zh.K. TULEMISOVA³,
Z.A. KOZHAKHMETOVA³, G.T. KASSENOVA⁴, K.A. MYRZABEK³

¹Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

³Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

⁴ENERGYMAX, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: mahmadenkalima@gmail.com

INFLUENCE OF BERRY EXTRACTS ON THE TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROBIOTIC YOGURT BASED ON LACTIC ACID BACTERIA

doi:10.53729/MV-AS.2023. 04.08

Abstract

This document describes the effect of berry extracts on the fermentation process, sensory parameters, and the number of viable bacterial cells of lactic acid bacteria in probiotic yogurt.

The document presents the results on the effect of berry extracts of *Rubus caesius* L. (blackberry) and *Rubus idaeus* L. (common raspberry) on the growth and reproduction of probiotic lactic acid bacteria, specifically *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, as well as commercial bacterial sourdough thermophilic *Streptococcus viscosus* (BZ-TV) (StST). Additionally, the document provides results on the fermentation kinetics and sensory characteristics of the final probiotic yogurt.

As a result, it was found that the addition of berry water extracts reduces the acidity of milk at the beginning of fermentation, after which the acidity becomes almost almost equal to that of the control sample. Fermentation of milk in the control sample (without berry extracts) was observed after 4.5 hours. Samples with raspberry and blackberry extracts fermented with a difference of 15 and 30 minutes, respectively.

The addition of berry extracts during the fermentation of the probiotic product was found not to reduce its sensory qualities. In other words, no deviations in acidity, taste, and consistency of the product were observed.

When determining the number of viable lactic acid bacteria cells in the final product on the 1st, 7th and 14th days, it was shown that the addition of berry extracts to the starter culture before fermentation had a positive effect on the viability of lactic acid bacteria. As a result, abundant growth of probiotic lactic acid bacteria was determined on the 3rd day of storage, with a cell count of not less than $1 \cdot 10^{10}$ CFU. Determination of CFU titers was carried out in the laboratory «Nurtitest» at the Kazakh Academy of Nutrition.

Keywords: probiotic yogurt, prebiotic, lactic acid bacteria, blackberry, raspberry.

A complete and balanced diet is the key to the health of a modern person. In this regard, the growth of the functional food market directly depends on the trend of deteriorating health in the population. It is known that poor ecology, antibiotic therapy, the use of pesticides, and unhealthy food lead to an imbalance in the human microbiome. The concept of functional nutrition comes from the philosophical traditions of the East, where there is no clear distinction between medicines and nutrition. Probiotics and prebiotics hold a special place in this concept [1,2].

In recent years, there has been an increasing focus among scientists on probiotics and prebiotics, and the publicity surrounding microbiome research has broadened the public's understanding of microorganisms. This extends beyond viewing them solely as disease-causing agents to be avoided, toward a more rational perspective that recognizes the beneficial role of microorganisms in human health. In line with these advances, public awareness and acceptance of probiotics and prebiotics continues to expand [3], with probiotic industry growth estimated at 7% per year and prebiotic growth projected at 12.7% over the next 8 years [4].

Microorganisms such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and other lactic acid-producing bacteria (LAB), predominantly isolated from fermented milk products and the intestinal microbiome, are used as probiotics.

Currently, many modern research methods are used, incl. sequencing method that allows to isolate and characterize a new spectrum of microorganisms used as next-generation probiotics from the human microbiome. On this basis, various bacteria have been isolated, such as *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium* spp., *Bacteroides* spp. and *Akkermansia muciniphila* from the human intestine [5, 6].

In the search for new probiotic candidates, not only the intestinal microbiome is of great interest, but also the female genitourinary tract, oral cavity, nasopharynx, and skin [7–9]. Also, the environment, soil, and plants can be sources of isolation of new types of bacteria [10].

When creating functional products with the addition of prebiotics, it is important to determine which prebiotic is most appropriate for the particular product being developed. Consideration should be given to the special characteristics of prebiotics, including their nutritional and technological properties, such as resistance to processing conditions, minimum and maximum concentrations that lead to the desired effects, and side effects [11].

Currently, there is a narrow range of confirmed prebiotic substances, among which galactans and fructans (for example, inulin) predominate. Current prebiotics are not always beneficial. The problem with traditional transport derivatives of prebiotics is that they also promote the growth of pathogenic bacteria [12] and have different bioavailability depending on the composition of the intestinal microbiota.

A number of studies have shown the ability to use FOS (fructooligosaccharides) by pathogenic strains of *Escherichia coli* [13-17] and various pathogenic streptococci [18, 19].

In an effort to stimulate a wider group of commensal organisms, new prebiotic candidate compounds have been developed. These include carbohydrate-based substances derived from plants—the source of traditional prebiotics such as inulin—but may also include substances that mimic animal-derived substrates (eg, milk oligosaccharides; O-linked glycans found in mucins), yeast substances and many non-carbohydrate substances, including polyphenols, fatty acids, herbs, and other micronutrients [20]. Of particular interest are polyphenols and plant sources rich in them.

In this direction, a lot of research has been carried out by foreign scientists. Deisy Hervert-Hernández et al. investigated the effects of a phenolic extract from grape pomace on the growth of *Lactobacillus acidophilus*. Their main discovery was that the phenolic extract of grape pomace significantly increased the biomass of *L. acidophilus* grown in liquid culture media [21]. Scientists A.P. do Espírito Santo studied the effect of passion fruit peel powder added to milk powder and whole milk during fermentation on fermentation kinetics, texture and bacterial viability in probiotic yogurt. [22].

Premalatha Muniandy in his studies determined the effect of green, white and black tea on lactic acid production, acid formation activity and viability level of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus* spp. in yogurt during 3 weeks of storage in the refrigerator [23]. Vendrame, S et al. (2011) conducted an in vivo study where people were given juice from wild blueberry powder for 6 weeks, which showed that juice consumption leads to the growth of *Bifidobacteria* in the human intestine [24].

A number of studies have also been done related to the antimicrobial properties of berry polyphenols, and their inhibitory effect on the growth of certain pathogens. In particular, Puupponen-Pimia et al (2001,2005) investigated the inhibitory properties of berry polyphenols and organic acids on the growth of intestinal pathogens [25, 26].

In this regard, we faced the task of determining the effect of berry extracts on probiotic yogurt prepared on the basis of active strains of lactic acid bacteria isolated and selected by us. For this, a test production of probiotic yogurt with and without addition (control samples) of berry extracts of *Rubus caesius* L. (blackberry gray) and *Rubus idaeus* L. (common raspberry) was carried out.

In the experiment, we studied the effect of berry extracts on the milk fermentation process, the resulting products' sensory indicators, and on the viability of lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3 and a commercial bacterial starter culture of thermophilic viscous streptococcus (BZ-TV) (StST) in the final product. Strains *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, with collection numbers B-RKM 0511 and B-RKM-0509, respectively, belong to the authors of this scientific article and were obtained from the collection of cultures of the Kazakh National Agrarian Research University.

Materials and methods of research

Objects of study: collection strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, a bacterial starter culture based on Streptococcus thermophiles strain, blackberry and raspberry. Strains *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3 have collection numbers B-RKM 0511 and B-RKM-0509, respectively, and were obtained from the culture collection of the Kazakh National Agrarian Research University. Previously, these LAB strains were isolated by the authors of a scientific article (Tulemisova Zh.K., Kozhakhmetova Z.A., Kasenova G.T.) from koumiss, a traditional fermented milk product in the educational and research laboratory "Microbiocyonoses and design of probiotics" at the Kazakh National agricultural research university.

Preparation of mother sourdough and fermentation process

The strains *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3 were grown in MRS medium for 24 hours. Subsequently, 0.5 ml of the culture was added to test tubes containing 10 ml of milk, and the mixture was placed in a thermostat until a stable clot formed.

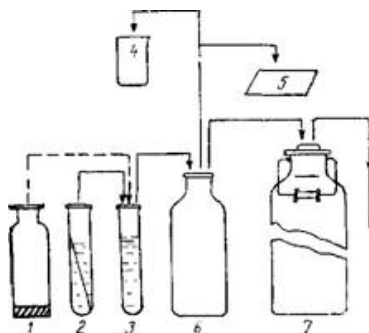


Figure 1 - Scheme of the mother sourdough preparation: 1 - dry thermophilic streptococcus from freeze-drying; 2 — liquid starter set from MRS medium; 3 - brisk culture after secondary reseeding in milk; 4 - organoleptic check of the starter in a glass; 5—check by microscopy; 6 - propagated culture in a flask; 7 - fermentation of the test probiotic product

The mixture was then cooled for 4 hours. Following this, a starter was created based on a combination of the two aforementioned LAB strains and a commercial bacterial starter culture of thermophilic viscous Streptococcus (BZ-TV) (StST) in a quantitative ratio of 2% - 2% - 1%, respectively.

Preparation of plant extracts

The preparation of plant extracts was conducted using the method described by Molan et al. with some modifications [27]. Berries (blackberries, raspberries) weighing 100 g were mixed with 100 ml of distilled water and ground using a blender (Philips). The resulting solution was centrifuged (3000 rpm, 15 min), and the plant liquid was then filtered through an ash filter. For sterilization purposes, the resulting liquid was autoclaved at 121°C and 1 bar for 10 minutes. The extracts were subsequently stored at -20°C for further use.

Test production and control of the fermentation process of the probiotic product

The prepared sourdough was used to ferment a probiotic product with and without berry extracts (control sample). The sourdough was added in the amount of 5% of the volume of milk, berry extracts 10% each. Next, the finished mixture of milk, starter and extracts was poured into sterile jars in a laminar box and placed in a thermostat at 37°C for fermentation.

During fermentation, acidity measurements were made for 3 samples using a pH meter. Measurements were taken at the beginning of fermentation and 3 and 4 hours after the start of fermentation. In order not to miss the pH -4.60 after 4 hours, measurements were taken more frequently, every 30 then 15 minutes. Fermentation proceeded until a good curd was formed and a pH of 4.60. After fermentation, the jars were cooled in the refrigerator.

Organoleptic evaluation

A tasting was conducted to evaluate the sensory characteristics of the products. In this study, we employed the profile, or descriptor-profile, method (Flavor Profile Method according to ISO 6564) [28]. This method is an organoleptic approach for assessing a set of features (aroma, taste, texture) using pre-selected descriptive characteristics (descriptors). It involves verbal descriptions and the quantitative expression of organoleptic features, evaluated on a points scale. Products were assessed for appearance, color, smell, taste, and texture on a 5-point scale.

Number of viable bacterial cells

To determine the CFU titers, 1 ml of the test product, the control sample, and the samples containing the plant extract were serially diluted 10-fold in physical solution and after 1 ml of an aliquot of the dilution was inoculated onto the surface of the MRS plates and incubated at 37°C for 48 hours. The number of viable bacterial cells was then counted. Cell counts were performed on the 1st, 7th, 14th days of product storage in the refrigerator.

Results and discussion

Fermentation control and schedule for probiotic products

To monitor the fermentation and the fermentation process of the desired product, acidity was measured during the entire fermentation of all 3 samples using a pH meter.

According to the data obtained from the control of fermentation, shown in Figure 3, changes in the pH values from the beginning of milk fermentation to the complete fermentation process for all three samples are shown. The graph indicates that the addition of plant extracts initially increases the acidity of milk during fermentation, after which the acidity becomes nearly equal to that of the control sample. Notably, the control sample completed fermentation in 4.5 hours, while samples with raspberry and blackberry extracts fermented with a difference of 15 and 30 minutes, respectively.

Acidity measurements for the resulting product were conducted the day after fermentation, where the control sample showed a pH value of 4.32, the blackberry sample - 4.28 and the raspberry sample - 4.22. Additionally, the graph results indicate that the addition of berry extracts does not significantly affect the acidity of the final product.

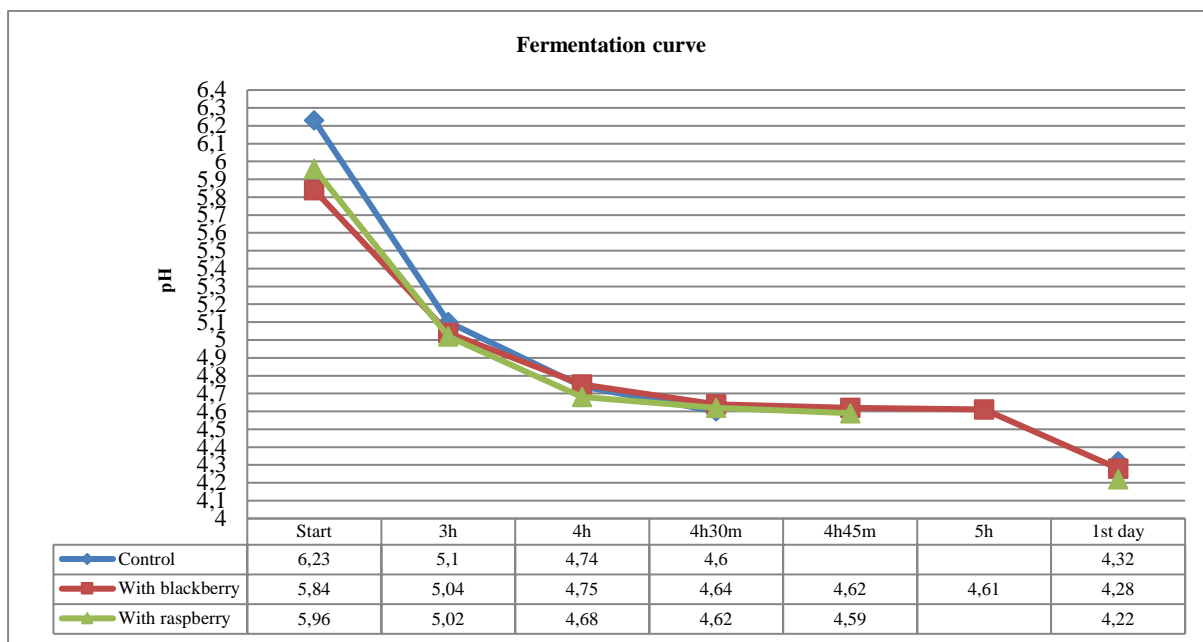


Figure 2 – Kinetic of pH changing during fermentation

Organoleptic evaluation of probiotic products

The organoleptic evaluation of the products was evaluated in terms of appearance, color, smell, taste and texture on a 5-point scale.

The data obtained from the experiment (Figure 4) showed a positive assessment of the products for each criterion. The results of the tasting did not reveal critical changes in the organoleptic characteristics of probiotic products. The control sample was slightly inferior in consistency and smell of the product to samples with the addition of plant extracts. The highest score for the best indicator for all the studied criteria was shown by the sample with blackberry.

It is important to note that when adding extracts during the fermentation of the probiotic product, no deviations in the acidity, taste and consistency of the product were detected. At the same time, the extract was distributed evenly throughout the entire structure of the product, there was no whey separation, and the clot was even and strong.

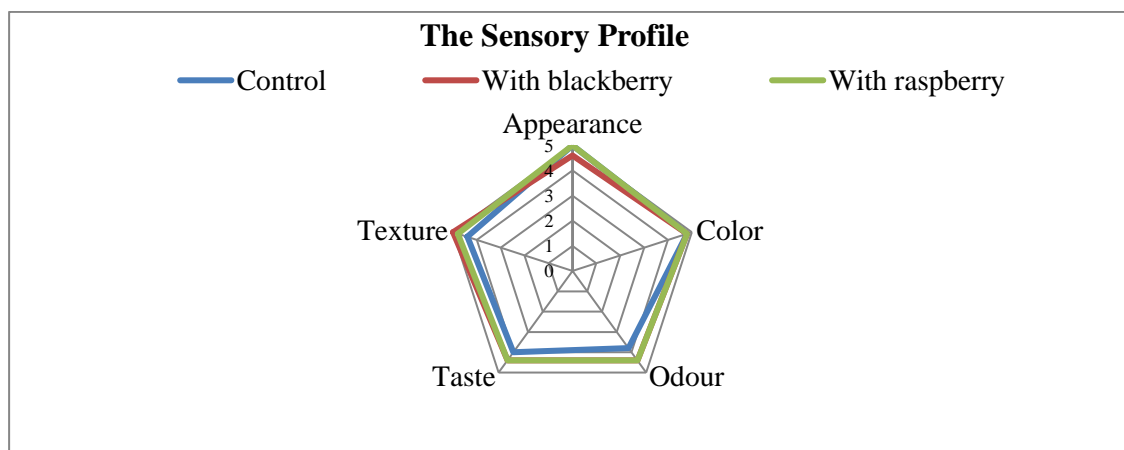


Figure 3 - Sensory profile of probiotic products

Number of viable bacterial cells

An important indicator of the evaluation of functional probiotic products is the number of viable cells in the final product consumed.

In this regard, we were faced with the task of determining the level of survival of probiotic starter cultures in the probiotic yogurt obtained during the test production, as a result of which positive indicators were obtained.

From the presented data (Figure 4) it is shown that the addition of berry extracts to the starter culture before fermentation has a positive effect on the viability of lactic acid bacteria. The obtained probiotic yoghurts with plant extract showed high titers of bacteria compared to the control sample. At the beginning of the determination of the survival of starter probiotic cultures, results were obtained with a difference of 65 and 70 CFU, on day 7 for 17 and 12 CFU, on day 14 30 and 25 CFU.

In order to confirm our results, the determination of CFU titers in the studied products was additionally carried out in the Nurtitest laboratory at the Kazakh Academy of Nutrition. Based on the results of the obtained data, it was found that abundant growth was observed in all three studied products on the 3rd day of storage, at least $1 \cdot 10^{10}$ CFU.

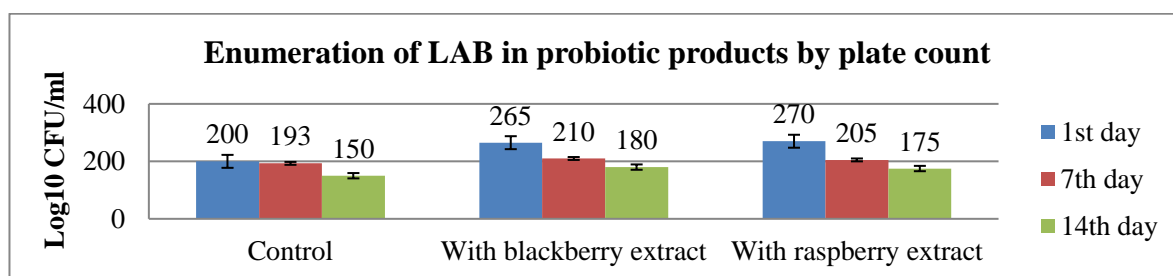


Figure 4 -Colony-forming units of LAB in probiotic products

Conclusion

In conclusion, the data obtained indicate that the addition of blackberry and raspberry extracts in the production of probiotic yogurt, based on LAB starter cultures, did not significantly affect the fermentation kinetics. Sensory indicators were positive for all samples, and the addition of plant extracts resulted in the most improved consistency and elasticity of the clot. All three types of yogurt obtained maintained high levels of lactic acid bacteria when stored in the refrigerator.

In our opinion, the obtained indicators could represent desirable product characteristic that benefits the health of the consumer and ensures the desire of producers to improve the organoleptic properties, protect the safety and effectiveness of functional products. It could also lead to a change from the traditional methods of dairy products production, rationalization of the composition, and the development of hybrid dairy products that include non-dairy ingredients.

In this regard, we believe that our research work addresses an urgent task for the dairy industry. It should be noted that further studies are needed to investigate the viability of starter lactic acid bacteria in yogurt after modeling gastrointestinal digestion. Additionally, consideration should be given to other methods of obtaining berry extracts, particularly in the form of a powder, which would facilitate their storage and use.

References:

- 1 Brodmann T., Endo A., Gueimonde M., Vinderola G., Kneifel W., de Vos W.M., and Gómez-Gallego C. Safety of novel microbes for human consumption: Practical examples of assessment in the European Union. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:1725 (doi:10.3389/fmicb.2017.01725)
- 2 Saubenova M., Oleynikova Ye., Chizhayeva A., Alybayeva A., Aytzhanova A., Amangeldi A., Potoroko I. Mikrobiota cheloveka i tsivilizatsii: v poiskakh vykhoda. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya*. 2022, 3(38), 4–22 (doi/10.53729/MV-AS.2022.03.01) Убрать лишние запяты

3 Cunningham M., Andrea M., Azcarate-Peril, Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D., Holscher H.D., Hunter K., Manurung S., Obis D., Petrova M.I., Steinert R.E., Swanson K.S., Sinderen D., Vulevic J., Gibson G.R. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics, *Trends in Microbiology*, 2021, 29(8), 667–685, ISSN 0966-842X (doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003)

4 Cunningham M., Azcarate-Peril M.A., Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D. and Gibson G.R. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(8):667–685 (doi:10.1016/j.tim.2021.01.003)

5 O'Toole P., Marchesi J., Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2. 2017, 17057 (doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57)

6 Brodmann T., Endo A., Gueimonde M., Vinderola G., Kneifel W., de Vos WM, Salminen S., Gómez-Gallego C. Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union. *Front Microbiol*. 2017, Sep 12; 8:1725 (doi: 10.3389/fmicb.2017.01725)

7 Maguire M., Maguire G. The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin health. *Arch. Dermatol. Res.* 2017, 309 (6), 411–421 (doi: 10.1007/s00403-017-1750-3)

8 George V.T., Varghese M.M., Vaseem M.S., Thomas A., Ittycheria P.G., Sreejith C.K. The Promising Future of Probiotics: A New Era in Periodontal Therapy. *Journal of International Oral Health*, 2016, 8, 404-408 (doi:10.2047/jioh-08-03-21)

9 Hayashida Sh., Takada K., Melnikov V.G., Komine-Aizawa Sh., Tsuji N.M., Hayakawa S., How were Lactobacillus species selected as single dominant species in the human vaginal microbiota? Coevolution of humans and Lactobacillus. *Medical Hypotheses*, 2022, 163, 110858, ISSN 0306-9877 (doi.org/10.1016/j.mehy.2022.110858)

10 Kumari R., Singh A., Yadav A.N., Mishra S., Sachan A., Sachan Sh.G., Chapter 11 - Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Current status and future uses for human health. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier. 2020, 173-190, ISBN 9780128205280 (doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00012-0)

11 Goh Y.J. and Klaenhammer T.R. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2015, 6(1):137–156 (doi:10.1146/annurev-food-022814-015706)

12 Venema K., Carmo A.P. *Probiotics and Prebiotics UK*: Caister Academic Press Norfolk, p. 275 -348. ISBN: 978-1-910190-10-4 (ebook), 2015

13 Dolejska M., Villa L., Minoia M., Guardabassi L., Carattoli A. Complete sequences of IncHI1 plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnrS1 in equine Escherichia coli provide new insights into plasmid evolution. *J. Antimicrob. Chemother*, 2014, 69 (9), 2388–2393 (doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015706)

14 Le Bouguéne C, Schouler C. Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. *Int.J. Med. Microbiol.* 2011, 301 (1), 1–6 (doi :10.1016/j.ijmm.2010.04.021)

15 Porcheron G., Chanteloup N.K., Trottereau A., Bree A., Schouler C. Effect of fructooligosaccharide metabolism on chicken colonization by an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *PLOS ONE*, 2012, 7 (4), e35475 (doi: 10.1371/journal.pone.0035475)

16 Porcheron G., Kut E., Canepa S., Maurel M.C., Schouler C. Regulation of fructooligosaccharide metabolism in an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *Mol. Microbiol.*, 2011, 81 (3), 717–733 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07725.x)

17 Schouler C., Taki A., Chouikha I., Moulin-Schouleur M., Gilot P. A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization. *J. Bacteriol.*, 2009, 191 (1), 388–393 (doi: 10.1128/JB.01052-08)

18 Hartemink R., Quataert M.C., van Laere K.M., Nout M.J., Rombouts F.M. Degradation and fermentation of fructo-oligosaccharides by oral streptococci. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, 79(5), 551–557 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03176)

19 Linke C.M., Woodiga S.A., Meyers D.J., Buckwalter C.M., Salhi H.E., King S.J. The ABC transporter encoded at the pneumococcal fructooligosaccharide utilization locus determines the ability to utilize long- and short-chain fructooligosaccharides. *J. Bacteriol.*, 2013, 195 (5), 1031–1041 (doi: 10.1128/JB.01560-12)

20 Cunningham M., Azcarate-Peril M.A., Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D., Gibson G.R. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 2021, 29 (8), 667–685 (doi:10.1016/j.tim.2021.01.003)

21 Hervert-Hernández D, Pintado C, Rotger R, Goñi I. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *Int J Food Microbiol*, 2009, Nov 30;136(1):119-22 (doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.016)

22 do Espírito Santo A.P., Perego P., Converti A. and Oliveira M.N. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 2012, 47(2):393–399.(doi:10.1016/j.lwt.2012.01.038)

23 Muniandy P., Shori A.B. and Baba A.S. Comparison of the effect of green, white and black tea on *streptococcus thermophilus* and *lactobacillus* spp. in yogurt during refrigerated storage. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 2017, 22(1):26–30 (doi:10.1016/j.jaubas.2015.11.002)

24 Vendrame S., Guglielmetti S., Riso P., Arioli S., Klimis-Zacas D. and Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(24):12815–12820 (doi:10.1021/jf2028686)

25 Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Hartmann-Schmidlin S., Kahkonen M., Heinonen M., Maatta-Riihinen K. and Oksman-Caldentey K.M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(4):991–1000 (doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x)

26 Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A. and Oksman-Caldentey K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 2001 90(4):494–507 (doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x)

27 Molan A.L., Lila M.A., Mawson J. and De S. In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7):1243–1249 (doi:10.1007/s11274-009-0011-9)

28 Sensory analysis – Methodology – Flavour profile methods [Text]: ISO 6564-1985. Geneva 1985

А.Г. НОГАЙБАЕВА¹, К. МАХМАДЕН^{2*}, Ж.К. ТУЛЕМИСОВА³,
З.А. КОЖАХМЕТОВА³, Г.Т. КАСЕНОВА⁴, К.А. МЫРЗАБЕК³

¹ Алматы технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

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

³ Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

⁴ENERGYMAX, Алматы, Қазақстан

* e-mail: mahmadenkalima@gmail.com

ЖИДЕК СЫҒЫНДЫЛАРЫНЫҢ ПРОБИОТИКАЛЫҚ ЙОГУРТТЫҢ АШУ ПРОЦЕСІНЕ, СЕНСОРЛЫҚ ПАРАМЕТРЛЕРІНЕ ЖӘНЕ СҮТҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ӨМІРШЕҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ ЖАСУШАЛАР САНЫНА ӘСЕРІ

Түйін

Бұл мақалада *Rubus caesius* L. (сұр қаражидек) және *Rubus idaeus* L. (қарапайым таңқурай) жидек сығындыларының *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 және *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* 018k сүт қышқылды бактерияларының өсуі мен көбеюіне әсері, пробиотикалық йогурттың ашу кинетикасы және сенсорлық параметрлері сипатталған. Зерттеу барысында қымыздан бөлініп алынған *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* 018k-3 штамдары және *Streptococcus thermophiles* коммерциялық штаммы мен жидектердің сығындысы қосылып пробиотикалық йогурт сынама түрінде дайындалды. Бақылау үлгісі ретінде жидек сығындыларынсыз йогурт дайындалды.

Жидек сығындылары ашу процесінің алғашқы сатысында сүттің қышқылдығын төмендететіні, ал 3 сағаттан кейін сүттің қышқылдылығы бақылау үлгісімен бірдей болатындығы анықталды. Бақылау үлгісінің ашу уақыты 4,5 сағатты құрады. Содан кейін таңқурай мен қаражидек қосылған үлгілер сәйкесінше 15 және 30 минуттық айырмашылықпен ашытылды. Пробиотикалық өнімді ашыту кезінде сығындыларды қосу өнімнің қышқылдығына, дәміне және консистенциясына

эсер еткен жоқ. Сығынды өнімнің бүкіл құрылымына біркелкі таралды, сарысудың бөлінуі болмады, біркелкі және қою ұйытылды.

Сондай-ақ сынақ кезінде сүт қышқылды бактерияларының өміршең жасушаларының саны 1-ші, 7-ші, 14-ші күні анықталды. Нәтижелер ферментация алдында ашытқы бактерияларына жидек сығындыларын қосу сүт қышқылды бактерияларының өміршеңдігіне оң әсер еткенін көрсетті. Сонымен қатар, Қазақ тағамтану академиясының Nutritest зертханасында КТБ титрі анықталды. Нәтижелер пробиотикалық йогурттар үшін сақтаудың 3-ші күні кемінде $1 \cdot 10^{10}$ КТБ мол өсім көрсетті.

Кілтті сөздер: каражидек, таңқурай, пребиотиктер, сүт қышқылы бактериялары.

МРНТИ: 34.27.19

А.Г. НОГАЙБАЕВА¹, К. МАХМАДЕН^{2*}, Ж.К. ТУЛЕМИСОВА³,
З.А. КОЖАХМЕТОВА³, Г.Т. КАСЕНОВА⁴, К.А. МЫРЗАБЕК³

¹Алматинский технологический университет, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

³Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

⁴ENERGYMAX, Алматы, Казахстан

*e-mail: mahmadenkalima@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ЯГОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА ПРОЦЕСС ФЕРМЕНТАЦИИ, СЕНСОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И КОЛИЧЕСТВО ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ЙОГУРТА

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.08

Аннотация

В статье описывается влияние ягодных экстрактов *Rubus caesius* L. (ежевика сизая) и *Rubus idaeus* L. (малина обыкновенная) на рост и размножение молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, кинетику ферментации и сенсорные показатели пробиотического йогурта.

В ходе исследования было сделано тестовое производство пробиотического йогурта с *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, выделенных из кумыса, и коммерческого штамма *Streptococcus thermophiles* с добавлением ягодных водных экстрактов и без (контрольный образец).

Выяснилось, что добавление экстрактов снижает кислотность молока в начале заквашивания, а спустя 3 часа кислотность практически выравнивается с контрольным образцом. Время закваски контрольного образца составило 4,5 часа. Затем заквасились образцы с малиной и с ежевикой с разницей в 15 и 30 минут, соответственно.

Добавление экстрактов во время сквашивания пробиотического продукта не повлияло на кислотность, вкус и консистенцию продукта. Экстракт был распределен равномерно по всей структуре продукта, отделения сыворотки не было, сгусток образовался ровный и крепкий.

Также в ходе теста определялось количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий в 1-й, 7-й, 14-й дни. Результаты показали, что добавление ягодных экстрактов в заквасочную культуру до ферментации влияет положительно на жизнеспособность молочнокислых бактерий. Дополнительно было сделано определение титров КОЕ в лаборатории «Нутритест» при Казахской Академии питания. Результат показал обильный рост молочнокислых бактерий для пробиотических йогуртов на 3 день хранения, не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ.

Ключевые слова: ежевика, малина, пребиотики, молочнокислые бактерии.

Полноценное и сбалансированное питание является залогом здоровья современного человека. Рост рынка продуктов функционального питания напрямую зависит от тенденции ухудшения здоровья населения. Плохая экология, антибиотикотерапия, использование

пестицидов в сельском хозяйстве, нездоровая пища ведут к дисбалансу микробиома человека. Концепция функционального питания происходит от философских традиций Востока, в которых нет явного различия между лекарствами и питанием. Особое место в этой концепции занимают пробиотики и пребиотики [1, 2].

Пробиотикам и пребиотикам в последние годы уделяется все больше внимания. В соответствии с этими достижениями общественное сознание и признание пробиотиков и пребиотиков продолжает расширяться [3], при этом рост индустрии пробиотиков оценивается в 7% в год, а пребиотический рост прогнозируется на уровне 12,7% в течение последних 8 лет [4].

Традиционно *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и другие бактерии, продуцирующие молочную кислоту, преимущественно выделенные из кисломолочных продуктов и фекального микробиома используются в качестве пробиотиков.

Секвенирование и современные методы культивирования позволили выделить и охарактеризовать новый спектр микроорганизмов из микробиома человека, которые могут быть пробиотиками нового поколения. Например, такие как *Roseburia intestinalis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium spp.*, *Bacteroides spp.* и *Akkermansia muciniphila*, были выделены из кишечника человека [5,6].

В поиске новых кандидатов - источников пробиотиков большой интерес представляет не только микробиом кишечника человека, но и женский мочеполовой тракт, полость рта, носоглотка и кожа [7–9]. Также источниками выделения новых видов бактерий могут быть окружающая нас среда, почва и растения [10].

При создании функциональных продуктов с добавлением пребиотиков важно определить, какой пребиотик является наиболее подходящим для конкретного разрабатываемого продукта. Следует принять во внимание особые характеристики пребиотиков, в том числе их питательные и технологические свойства, такие как устойчивость к условиям обработки, минимальные и максимальные концентрации, позволяющие достичь желаемых эффектов, с учетом побочного действия [11].

В настоящее время существует узкий круг подтвержденных пребиотических веществ, среди которых преобладают галактаны и фруктаны (например, инулин). Существующие на сегодня пребиотики не всегда приносят пользу. Проблема с традиционными транспортными производными пребиотиков заключается в том, что они также способствуют росту патогенных бактерий [12] и обладают различной биодоступностью в зависимости от состава кишечной микробиоты.

В ряде исследований показана способность использования ФОС (фруктоолигосахариды) патогенными штаммами *Escherichia coli* [13-17] и различными патогенными видами стрептококков [18,19].

Стремление стимулировать более широкую группу комменсальных организмов позволило разработать новые пребиотические соединения-кандидаты. Они включают в себя вещества на основе углеводов, полученные из растений — источников традиционных пребиотиков, таких как инулин, — но могут также включать вещества, имитирующие субстраты животного происхождения (например, олигосахариды молока; О-связанные гликаны, содержащиеся в муцинах), дрожжевые вещества и многие неуглеводные вещества, включая полифенолы, жирные кислоты, травы и другие микроэлементы [20]. Особый интерес занимают полифенолы и растительные источники, богатые ими.

Очень много исследований сделано зарубежными учеными в этой области. Deisy Hervert-Hernández и др. исследовали влияние фенольного экстракта виноградных выжимок на рост *Lactobacillus acidophilus*. Основным открытием было то, что фенольный экстракт виноградных выжимок вызвал значительное увеличение биомассы *L. acidophilus*, выращенного в жидких культуральных средах [21]. А.Р. do Espírito Santo провели исследование, где они добавляли порошок кожуры маракуйи в сухое и цельное молоко во время сквашивания, изучали влияние на кинетику ферментации, текстуру и жизнеспособность бактерий в пробиотическом йогурте [22]. Premalatha Muniandy изучили

влияние зеленого, белого и черного сортов чая на производство молочной кислоты, кислотообразование и жизнеспособность *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus spp.* в йогурте во время 3-недельного хранения в холодильнике [23]. Vendrame, S и др. (2011) провели *in vivo* исследование, где людям давали пить сок из порошка дикой черники в течение 6 недель. Результат исследования показал, что потребление сока приводит к росту *Bifidobacteria* в кишечнике человека [24].

Также был проведен ряд исследований, связанных с антимикробными свойствами ягодных полифенолов, и их ингибирующим действием на рост некоторых патогенов. В частности, Руурпонен-Римиа и др. исследовали ингибирующие свойства ягодных полифенолов и органических кислот на рост кишечных патогенов [25, 26].

В этом исследовании было проведено тестовое производство пробиотического йогурта с добавлением ягодных экстрактов *Rubus caesius L.* (ежевика сизая) и *Rubus idaeus L.* (малина обыкновенная), и без добавления - контрольные образцы. Изучено влияние ягодных экстрактов на процесс ферментации, сенсорные показатели и жизнеспособность молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, *Streptococcus thermophiles* (коммерческий штамм).

Материалы и методы исследования

Объекты исследования: ежевика, малина, *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, *Streptococcus thermophiles* (коммерческий штамм). *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3, коллекционные номера В-РКМ 0511 и В-РКМ-0509, соответственно, были получены из коллекции культур Казахского национального аграрного исследовательского университета. Ранее МКБ были выделены из кумыса, традиционного кисломолочного напитка в учебно-научно-исследовательской лаборатории «Микробиоцинозов и конструирование пробиотиков» при Казахском национальном аграрном исследовательском университете.

Приготовление маточной закваски и процесс ферментации.

Штаммы *Lactobacillus acidophilus* 0015k-1 и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 018k-3 выращивались в MRS среде в течение 24 часов, далее 0,5 мл вносили в пробирки с молоком (10 мл) и ставили в термостат до появления стабильного сгустка, далее охлаждали в течение 4 часов. Затем делали готовую закваску из 2 штаммов и *Streptococcus thermophiles* (коммерческий штамм), в количественном соотношении 2%–2%–1%, соответственно.

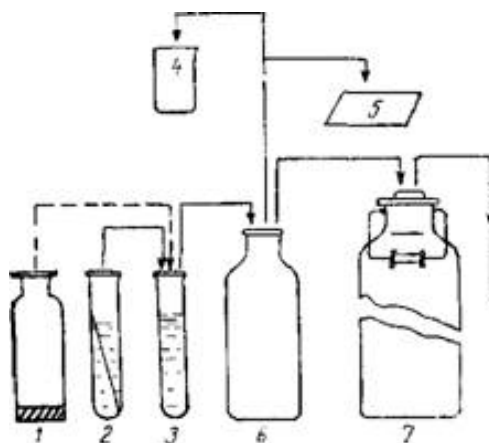


Рисунок 1- Схема приготовления маточной закваски: 1- сухой термобактериальный препарат из сублимационной сушки; 2 — жидкий заквасочный набор из MRS среды; 3— оживленная культура после второго пересева на молоке; 4 — органолептическая проверка закваски в стаканчике; 5— проверка микроскопированием; 6 — размноженная культура в колбе; 7 — заквашивание тестового пробиотического продукта

Приготовление растительных экстрактов

Методика приготовления растительных экстрактов. Растительные экстракты были приготовлены по методике Molan и др. с некоторыми изменениями [27]. Неочищенные водные экстракты ягод (ежевика, малины) взвешивали (100 г), смешивали со 100 мл дистиллированной воды и измельчали с помощью блендера (Philips). Полученный раствор центрифугировали (3000 об, 15 мин), затем растительную жидкость фильтровали через зольный фильтр. Для стерилизации экстракты автоклавировали при 121°C при 1 БАР в течение 10 минут. Водные экстракты растений хранили при -20 °С для дальнейшей работы.

Тестовое производство и контроль процесса сквашивания пробиотического продукта

Приготовленную закваску использовали для заквашивания пробиотического продукта с ягодными экстрактами и без них (контрольный образец). Закваску вносили в количестве 5% от объема молока, ягодные экстракты - по 10 %. Далее готовую смесь из молока, закваски и экстрактов разливали в стерильные баночки в ламинарном боксе и ставили в термостат при +37°C. В течение ферментации были сделаны измерения кислотности для 3-х образцов с помощью рН метра в начале теста, через 4 часа после начала сквашивания. После измерения рН проводили чаще, каждые 30, затем каждые 15 минут. Ферментация проходила до образования хорошего сгустка и рН 4,60. После ферментации баночки охлаждали в холодильнике.

Органолептическая оценка

Для оценки сенсорных показателей продуктов была проведена дегустация. В этой работе использовался профильный, дескрипторно-профильный, метод (Flavour Profile Method по ISO 6564) [28], органолептический метод оценки совокупности признаков-свойств (аромата, вкуса, консистенции) с использованием предварительно выбранных описательных характеристик-дескрипторов. Метод подразумевает словесное описание и количественное выражение органолептических признаков, оцениваемых в баллах. Продукты оценивались по внешнему виду, цвету, запаху, вкусу и консистенции по 5-балльной шкале.

Количество жизнеспособных бактериальных клеток

Для определения титров КОЕ 1 мл тестового продукта, контрольный образец и образцы, содержащие растительный экстракт, последовательно разводили в 10 раз в физическом растворе и после 1 мл аликвоты разведения инокулировали на поверхность чашек Петри с питательной средой MRS и инкубировали при +37°C в течение 48 часов. Затем подсчитывали количество жизнеспособных бактериальных клеток. Подсчет клеток проводили через день, неделю и две недели после хранения продукта в холодильнике.

Результаты и обсуждение

Контроль ферментации и график сквашивания пробиотических продуктов

В течение ферментации были сделаны измерения кислотности 3-х образцов с помощью рН метра. График ферментации показывает изменение значения рН от начала заквашивания до полного сквашивания продуктов (рисунок 2). Показано, что добавление экстрактов снижает кислотность молока в начале заквашивания, далее кислотность практически выравнивается с контрольным образцом. Первым заквасился контрольный образец - за 4,5 часа, далее – образцы с малиной и ежевикой, с разницей в 15 и 30 минут, соответственно. В первый день после заквашивания контрольный образец показал рН 4,32, продукт с ежевикой – 4,28, с малиной – 4,22. Установлено, что добавление ягодных экстрактов незначительно влияет на кислотность продукта.

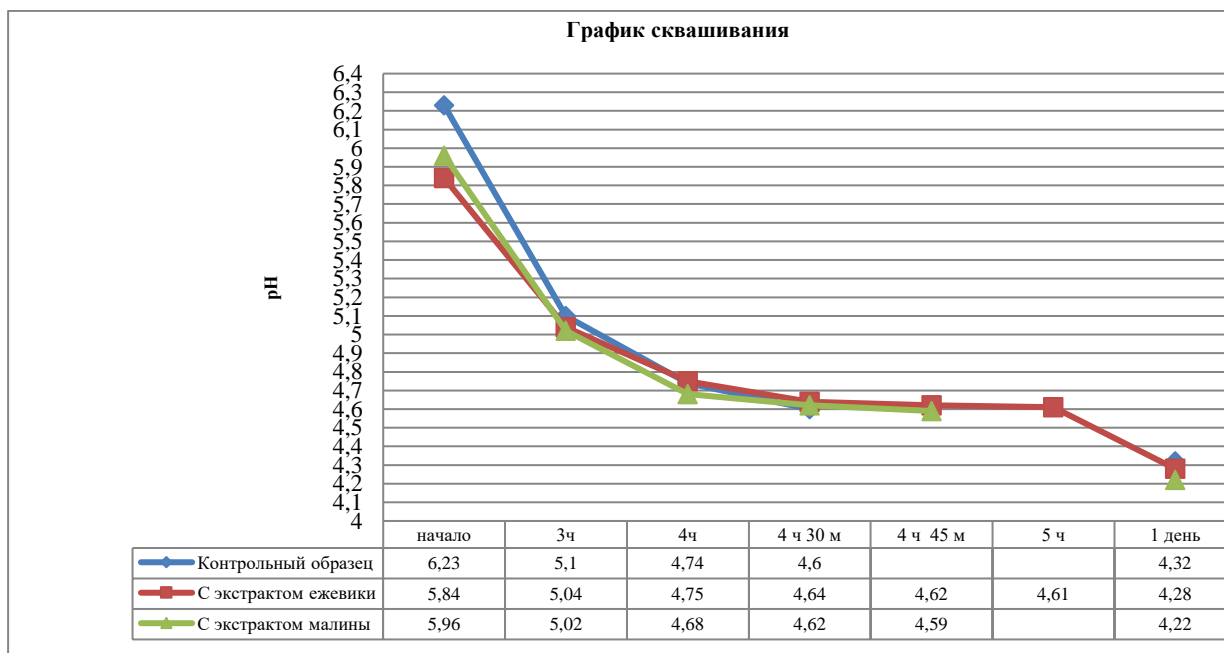


Рисунок 2– График изменения рН во время ферментации

Органолептическая оценка пробиотических продуктов

Продукты оценивались по внешнему виду, цвету, запаху, вкусу и консистенции по 5-балльной шкале. На рисунке 3 представлены средние оценки продуктов по каждому критерию. Результаты дегустации не выявили критических изменений в органолептических показателях пробиотических продуктов. Контрольный образец незначительно уступал в оценках консистенции и запахе продуктов. Продукт с ежевикой показал немного лучшие результаты по сравнению продуктом с малиной. Добавление экстрактов во время сквашивания пробиотического продукта не выявило отклонений в кислотности, вкусе и консистенции продукта. Экстракты были распределены равномерно по всей структуре продукта, отделения сыворотки не было, сгусток ровный и крепкий.

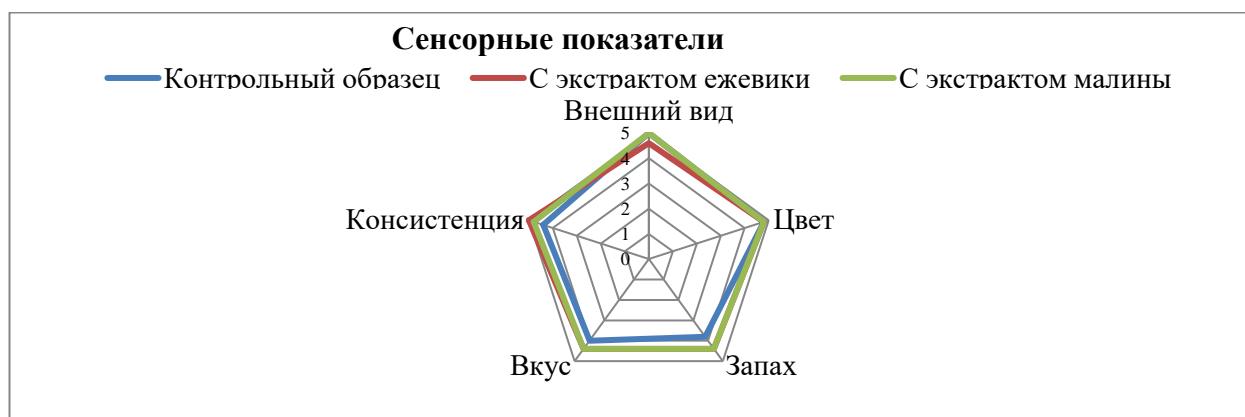


Рисунок 3 – Сенсорный профиль пробиотических продуктов

Количество жизнеспособных бактериальных клеток

Важным показателем оценки функциональных пробиотических продуктов является количество жизнеспособных клеток в потребляемом конечном продукте.

В связи с этим перед нами стояла задача определить уровень приживаемости пробиотических заквасок в пробиотическом йогурте, полученном при опытно-производстве, в результате чего были получены положительные показатели.

Из представленных данных (рисунок 4) видно, что добавление ягодных экстрактов в закваску перед ферментацией положительно влияет на жизнеспособность молочнокислых бактерий. Полученные пробиотические йогурты с растительным экстрактом показали высокие титры бактерий по сравнению с контрольным образцом. В начале определения выживаемости заквасочных пробиотических культур были получены результаты с разницей 65 и 70 КОЕ, на 7-е сутки - 17 и 12 КОЕ, на 14-е сутки - 30 и 25 КОЕ.

Для подтверждения наших результатов определение титров КОЕ в исследуемых продуктах дополнительно проводили в лаборатории «Нуртитест» Казахской академии питания. По результатам полученных данных установлено, что обильный рост наблюдался у всех трех исследуемых продуктов на 3-и сутки хранения, не менее $1 \cdot 10^{10}$ КОЕ.

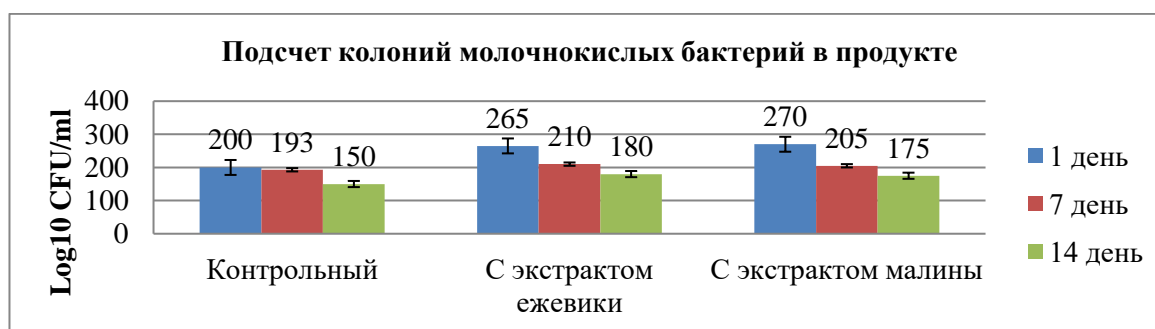


Рисунок 4- Подсчет колоний молочнокислых бактерий

Заключение

Таким образом, полученные данные показали, что добавление экстрактов ежевики и малины при производстве пробиотического йогурта на основе заквасок МКБ не оказывает существенного влияния на кинетику ферментации. Органолептические показатели были положительными для всех образцов, при добавлении растительных экстрактов получен наиболее улучшенный показатель по консистенции и эластичности сгустка. Все три вида полученного йогурта имели высокий уровень молочнокислых бактерий при хранении в холодильнике при $+6 - +8^{\circ}\text{C}$.

Полученные результаты могут расширить ассортимент продуктов питания функционального назначения. Следует отметить, что необходимы дальнейшие исследования для изучения жизнеспособности молочнокислых бактерий в йогурте через моделированный желудочно-кишечного тракт. Также необходимо рассмотреть другие способы получения экстрактов ягод, в частности в виде порошка, что облегчит их хранение и использование.

Литература:

1 Brodmann T., Endo A., Gueimonde M., Vinderola G., Kneifel W., de Vos W.M., and Gómez-Gallego C. Safety of novel microbes for human consumption: Practical examples of assessment in the European Union. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:1725 (doi:10.3389/fmicb.2017.01725)

2 Саубенова М., Олейникова Е., Чижасева А., Алыбаева А., Айтжанова А., Амангелді А., Потороко И. Микробиота человека и болезни цивилизации: в поисках выхода. *Микробиология және вирусология*. 2022, 3(38), 4–22 (doi.org/10.53729/MV-AS.2022.03.01)

3 Cunningham M., Andrea M., Azcarate-Peril, Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D., Holscher H.D., Hunter K., Manurung S., Obis D., Petrova M.I., Steinert R.E., Swanson K.S., Sinderen D., Vulevic J., Gibson G.R. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics, *Trends in Microbiology*, 2021, 29(8), 667-685, ISSN 0966-842X (doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003)

4 Cunningham M., Azcarate-Peril M.A., Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D. and Gibson G.R. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(8):667–685 (doi:10.1016/j.tim.2021.01.003)

- 5 O'Toole P., Marchesi J., Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol* 2. 2017, 17057 (doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57)
- 6 Brodmann T., Endo A., Gueimonde M., Vinderola G., Kneifel W., de Vos WM, Salminen S., Gómez-Gallego C. Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union. *Front Microbiol.* 2017, Sep 12; 8:1725 (doi: 10.3389/fmicb.2017.01725)
- 7 Maguire M., Maguire G. The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin health. *Arch. Dermatol. Res.* 2017, 309 (6), 411–421 (doi: 10.1007/s00403-017-1750-3)
- 8 George V.T., Varghese M.M., Vaseem M.S., Thomas A., Ittycheria P.G., Sreejith C.K. The Promising Future of Probiotics: A New Era in Periodontal Therapy. *Journal of International Oral Health*, 2016, 8, 404-408 (doi:10.2047/jioh-08-03-21)
- 9 Hayashida Sh., Takada K., Melnikov V.G., Komine-Aizawa Sh., Tsuji N.M., Hayakawa S., How were Lactobacillus species selected as single dominant species in the human vaginal microbiota? Coevolution of humans and Lactobacillus. *Medical Hypotheses*, 2022, 163, 110858, ISSN 0306-9877 (doi.org/10.1016/j.mehy.2022.110858)
- 10 Kumari R., Singh A., Yadav A.N., Mishra S., Sachan A., Sachan Sh.G., Chapter 11 - Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Current status and future uses for human health. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Elsevier.* 2020, 173-190, ISBN 9780128205280 (doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00012-0)
- 11 Goh Y.J. and Klaenhammer T.R. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annual Review of Food Science and Technology.* 2015, 6(1):137–156 (doi:10.1146/annurev-food-022814-015706)
- 12 Venema K., Carmo A.P. *Probiotics and Prebiotics UK: Caister Academic Press Norfolk*, p. 275–348. ISBN: 978-1-910190-10-4 (ebook), 2015
- 13 Dolejska M., Villa L., Minoia M., Guardabassi L., Carattoli A. Complete sequences of IncHII plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnrS1 in equine *Escherichia coli* provide new insights into plasmid evolution. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, 69 (9), 2388–2393 (doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015706)
- 14 Le Bouguéne C, Schouler C. Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. *Int.J. Med. Microbiol.* 2011, 301 (1), 1–6 (doi :10.1016/j.ijmm.2010.04.021)
- 15 Porcheron G., Chanteloup N.K., Trotureau A., Bree A., Schouler C. Effect of fructooligosaccharide metabolism on chicken colonization by an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *PLOS ONE*, 2012, 7 (4), e35475 (doi: 10.1371/journal.pone.0035475)
- 16 Porcheron G., Kut E., Canepa S., Maurel M.C., Schouler C. Regulation of fructooligosaccharide metabolism in an extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain. *Mol. Microbiol.*, 2011, 81 (3), 717–733 (doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07725.x)
- 17 Schouler C., Taki A., Chouikha I., Moulin-Schouleur M., Gilot P. A genomic island of an extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain enables the metabolism of fructooligosaccharides, which improves intestinal colonization. *J. Bacteriol.*, 2009, 191 (1), 388–393 (doi: 10.1128/JB.01052-08)
- 18 Hartemink R., Quataert M.C., van Laere K.M., Nout M.J., Rombouts F.M. Degradation and fermentation of fructo-oligosaccharides by oral streptococci. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, 79(5), 551–557 (doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03176)
- 19 Linke C.M., Woodiga S.A., Meyers D.J., Buckwalter C.M., Salhi H.E., King S.J. The ABC transporter encoded at the pneumococcal fructooligosaccharide utilization locus determines the ability to utilize long- and short-chain fructooligosaccharides. *J. Bacteriol.*, 2013, 195 (5), 1031–1041 (doi: 10.1128/JB.01560-12)
- 20 Cunningham M., Azcarate-Peril M.A., Barnard A., Benoit V., Grimaldi R., Guyonnet D., Gibson G.R. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 2021, 29 (8), 667–685 (doi:10.1016/j.tim.2021.01.003)
- 21 Hervert-Hernández D, Pintado C, Rotger R, Goñi I. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *Int J Food Microbiol*, 2009, Nov 30;136(1):119-22 (doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.016)
- 22 do Espírito Santo A.P., Perego P., Converti A. and Oliveira M.N. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 2012, 47(2):393–399.(doi:10.1016/j.lwt.2012.01.038)

23 Muniandy P., Shori A.B. and Baba A.S. Comparison of the effect of green, white and black tea on *streptococcus thermophilus* and *lactobacillus* spp. in yogurt during refrigerated storage. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 2017, 22(1):26–30 (doi:10.1016/j.jaubas.2015.11.002)

24 Vendrame S., Guglielmetti S., Riso P., Arioli S., Klimis-Zacas D. and Porrini M. Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(24):12815–12820 (doi:10.1021/jf2028686)

25 Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Hartmann-Schmidlin S., Kahkonen M., Heinonen M., Maatta-Riihinen K. and Oksman-Caldentey K.M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(4):991–1000 (doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02547.x)

26 Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Meier C., Kahkonen M., Heinonen M., Hopia A. and Oksman-Caldentey K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 2001 90(4):494–507 (doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x)

27 Molan A.L., Lila M.A., Mawson J. and De S. In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7):1243–1249 (doi:10.1007/s11274-009-0011-9)

28 Sensory analysis – Methodology – Flavour profile methods [Text]: ISO 6564-1985. Geneva 1985

IRSTI: 68.41.05, 68.41.53, 68.41.55

R.S. SATTAROVA^{1*}, V.M. STROCHKOV¹, K.E. BORANBAEVA¹, N.A. ZAMANBEKOV²
F.A. BAKIEV¹, K.M. SHYNYBAEV¹, M.S. OSPANOVA³, K. SMAN⁴,
G.N. SPIRIDONOV⁵

¹Kazakh Scientific Research Veterinary Institute, Almaty, Kazakhstan

²Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

³M. Auezov South Kazakhstan State University, Shymkent, Kazakhstan

⁴Abai Kazakh National Pedagogical University, Almaty, Kazakhstan

⁵Federal Centre for Toxicological, Radiation, and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

*e-mail: ranosaitomarovna@gmail.ru

COMPARATIVE DIAGNOSTICS FOR INFECTIOUS AND INVASIVE KERATOCONJUNCTIVAS OF CATTLE

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.09

Abstract

The article presents the results of comparative studies in infectious and invasive keratoconjunctivitis of cattle for 2023. 542 conjunctival samples of cattle from economic entities of Akmola, Zhetysu, Turkestan and Kostanay regions were studied. Real-time polymerase chain reaction was carried out with a set of «PCR-Moraxella-RV» reagents to identify three causative agents of Pink eye - *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis*, *Moraxella bovoculi*. 15 positive samples from the Akmola region were identified as *Moraxella bovoculi* (100%), 33.3% were identified as *Moraxella ovis*, and 6.7% were identified as *Moraxella bovis*. During a microscopic examination of conjunctival swabs from the same animals, thelazias were detected in 224 samples, which amounted to 43.1%.

Keywords: keratoconjunctivitis, *Moraxella*, *Thelasia*, cattle.

Diseases of the visual organs of cattle are spreading rapidly in large livestock complexes with crowded housing of animals. Contagious eye diseases of animals cause significant economic damage to livestock farms [1-4] due to premature culling of animals, loss of their breeding value, reduction in milk yield, increase in live body weight, costs of veterinary-sanitary and special veterinary measures [5, 6]. The highest incidence rate is observed in calves aged 1–6 months. (50–70%). In the rearing and fattening groups, especially when livestock are located in areas with high population density, the disease is recorded in up to 30%. Keratoconjunctivitis among dairy herds ranges from 10-12% [7].

On livestock farms, animal eye diseases are recorded year-round, but most frequently in the summer months, when cattle are on pasture and are susceptible to attack by insects (*Musca domestica*, *Musca autumnalis*) that carry the pathogen [8,9]. The disease is characterized by lacrimation, hyperemia of conjunctival vessels, photophobia, serous-purulent discharge, clouding and ulceration of the cornea, deformation of the eyeball in the form of keratoglobus or keratoconus, partial or complete loss of vision in the affected eye of the animal [10,13]. Infectious keratoconjunctivitis of Pink eye of cattle is an infectious disease characterized by eye damage, manifested by lacrimation, hyperemia of conjunctival vessels, photophobia, clouding and ulceration of the cornea, deformation of the eyeball in the form of keratoglobus or keratoconus, partial or complete loss of vision [10,11].

Thelaziosis is a helminthic disease of cattle, manifested by conjunctival keratitis, caused by parasitism of nematodes of the suborder Spirurata, family Thelaziidae in the ducts of the lacrimal gland, the nasolacrimal canal, under the third eyelid and in the conjunctival sac [16]. The disease is acute in young animals and, as a rule, is complicated by a second infection, which is accompanied by keratoconjunctivitis of various forms, incl. Pink eye of cattle.

The purpose of the research was to conduct a comparative diagnosis of infectious keratoconjunctivitis in cattle microscopically for parasitic and real-time polymerase chain reaction for bacterial lesions.

Materials and methods of research

Biological material for the study was obtained by conjunctival irrigation and nostrils using sterile swabs. Sample collection was carried out according to the sampling protocol [12]. 542 samples from affected eyes of cattle were tested. Laboratory tests were carried out microscopy [13] of conjunctival swabs and using a set of «PCR-Moraxella-RV» reagents to identify the causative agent of Pink eye by multiplex polymerase chain reaction method in real-time mode, developed by scientists of the Kazakh Research Veterinary Institute (SO LPP 071240018450-002-2023).

The PCR was performed according to the developed protocol in accordance with table 1.

Table 1 – RT PCR amplification protocol

Cycle	Temperature, °C	Time	Fluorescence measurement	The number of cycles
1	95	5 minutes	-	1
2	95	10 sec	-	40
	56	20 sec	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	20 sec	-	

The obtained data—fluorescent signal accumulation curves—were analyzed using the software of the device used to carry out real-time PCR in accordance with the manufacturer's instructions for the device. The result of DNA amplification of *Moraxella bovoculi* is detected the FAM/Green channel, DNA of *Moraxella ovis* by the JOE/Yellow channel, DNA of *Moraxella bovis* the by ROX/Orange channel.

The results of PCR analysis were taken into account by the presence or absence of intersection of the fluorescence curve with the threshold line set at the appropriate level (which corresponds to the presence or absence of the threshold cycle “Ct” value for the test sample).

Results and discussion

During the study period, from May 2021 to October 2023, 2971 heads of cattle of different breeds age and sex groups were examined. Of these 214 cattle were identified with clinical signs of keratoconjunctivitis from which samples in the amount of 542 samples were taken. Animals from the Eskeldinsky (66 samples), Sarkandsky (78 samples), Alakolsky (43 samples) districts of the Zhetysu region, the Aryssky district of the Turkestan region (96 samples), cattle from peasant farms (249 samples) of the Astrakhan district of the Akmola region and “Obagan auyly” Kostanay region (10 samples).

Thelasia cause mechanical irritation of the conjunctiva of the eyes, damaging the cornea, mucous membrane, releasing metabolic products, reducing immunity, occurring with clinical manifestations similar to Pink eye. For this purpose, swabs were additionally examined for the presence of thelasia in samples (Figure 1). A total of 542 (swabs from the conjunctiva and nostrils) samples were studied and subjected to real-time polymerase chain reaction and microscopy testing for the presence of nematode larvae.

Table 1 - Information on biosampling

Name		Number of iss alive	Number of wedges and patients alive	Number of samples examined				
regions	districts			flushing	flushing conjunctiva		nasal cavity	
					left	right	left	right
Zhetysuskaya	Eskeldy	172	22	66	26	17	10	13
	Sarkand	144	26	78	19	19	24	16
	Alakol	409	24	43	15	7	14	7
Turkestan	Arys	127	24	96	24	24	24	24
Akmola	Astrakhan	2119	118	249	129	98	10	12
Kostanay	Altynsarin	-	-	10	4	6	-	-
Total		2971	214	542	217	171	82	72

We also tried to take biosamples from the mucous membranes of the nasal cavity from the side of the diseased eye and from the nostrils with serious discharges, because *Thelazia rhodesi*, affects the conjunctival sac, the area of the third eyelid, and *T. gulosa* and *T. skrjabini* live in the nasolacrimal canal and lacrimal gland. Depending on the clinical condition, 1 or 2, sometimes 3, maximum 4 samples were taken from one animal with signs of conjunctivitis, i.e. If an animal had clinical lesions in both eyes and nostril discharge was observed, samples were taken from each eye and nostril simultaneously. The results of the study are shown in Table 2.

Table 2 - Information on the distribution of infectious and invasive keratoconjunctivitis among cattle in some regions of the Republic of Kazakhstan

Name		Laboratory results								
regions	districts	microscopy					RT-PCR			
		flushing	flushing conjunctiva		nasal cavity		flushing conjunctiva		nasal cavity	
			reseeded	positive	reseeded	positive	reseeded	positive	reseeded	positive
Zhetysuskaya	Eskeldy	66	43	43	23	-	43	-	-	-
	Sarkand	78	38	38	40	-	38	-	-	-
	Alakol	43	22	22	21	-	22	-	-	-
Turkestan	Arys	96	48	0	48	-	48	-	-	-
Akmola	Astrakhan	249	227	112	22	-	227	15	-	-
Kostanay	Altynsarin	10	10	9	-	-	10	-	-	-
Total		542	388	224	154	0	388	15	154	0

According to Table 2, of the 187 samples studied from peasant farms in the Zhetysu region, nematodes were found in 103 conjunctival washings. A similar picture was observed in the study of 249 samples from the Akmola region (112 positive samples) and Kostanay (9 positive samples) regions, while in 154 swabs from the nasal cavity no thelasia were found.

Real-time polymerase chain reaction revealed DNA from *Moraxella* cultures only from the Akmola region, i.e. out of 227 conjunctival swabs, 15 reacted positively, in particular, in 15 samples that reacted positively to *Moraxella bovoculli*, 5 samples were identified as *Moraxella bovoculli* and *Moraxella ovis* and one sample to *Moraxella bovoculli*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovis* (Figures 2 - 4)

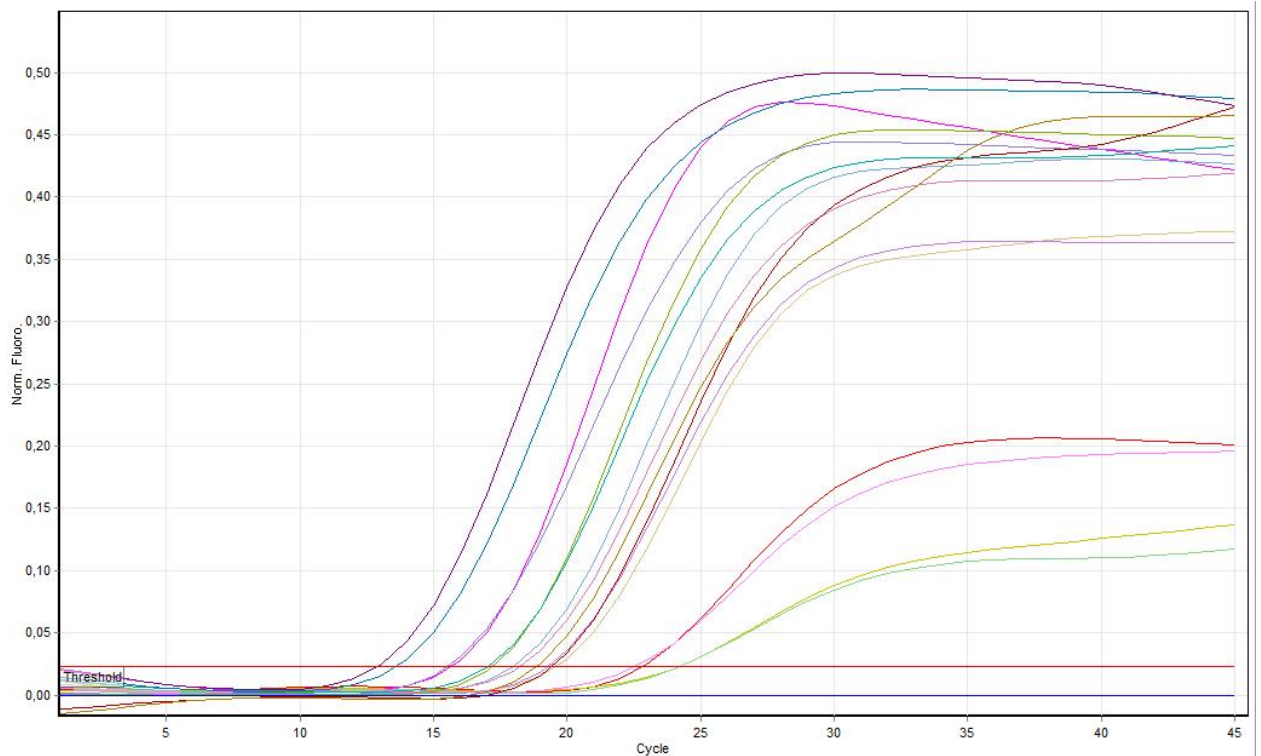


Figure 2 - Amplification curves for field samples Green channel (*M. bovoculi*)

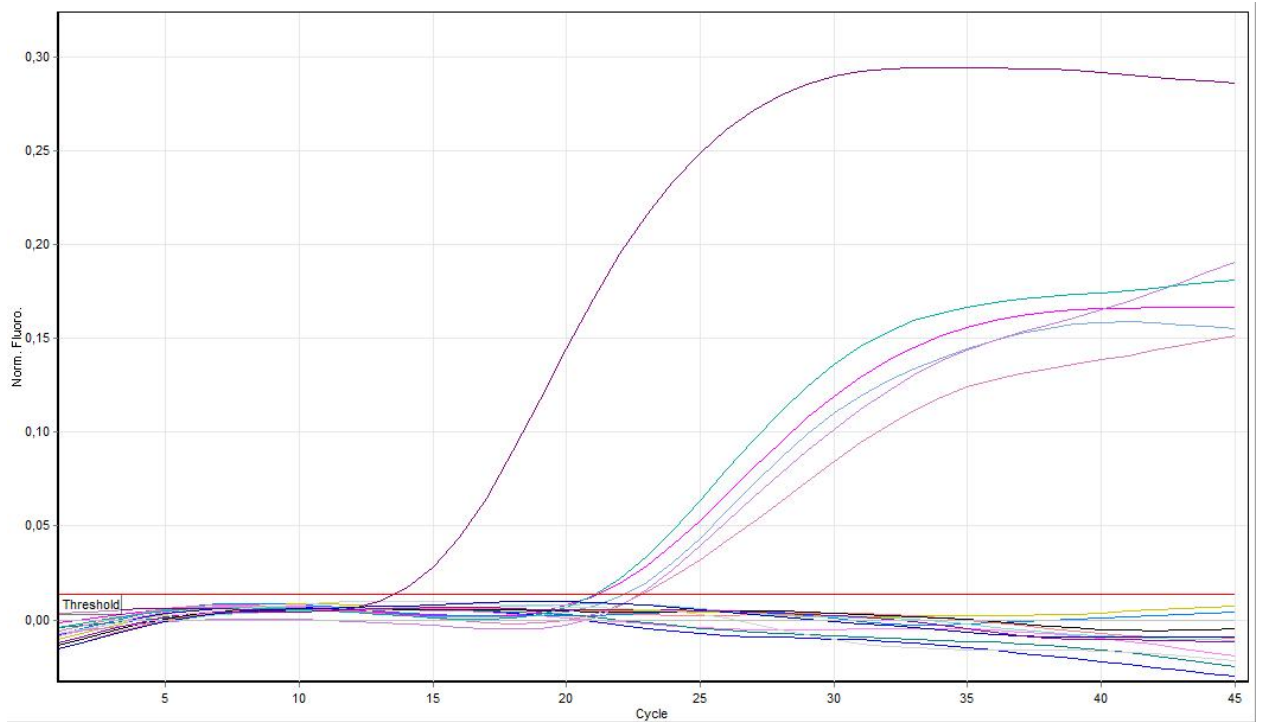


Figure 3 - Amplification curves for field samples Yellow channel (*M. ovis*)

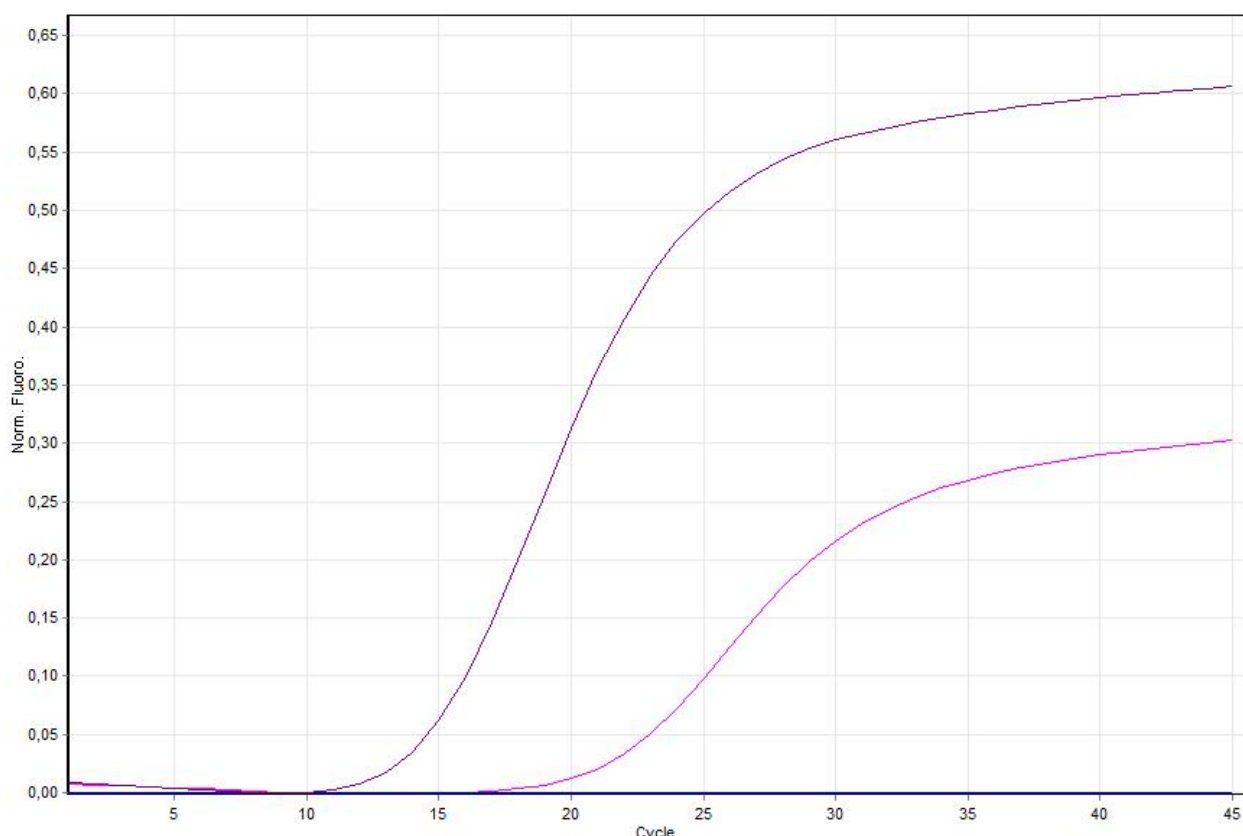


Figure 4 - Amplification curves for field samples Yellow channel Orange channel (*M. bovis*)

Thelyasia cause mechanical irritation of the conjunctiva of the eyes, damaging the cornea, mucous membrane, releasing metabolic products, reducing immunity, occurring with clinical manifestations similar to moraxellosis. In order to differentiate moraxellosis, swabs were examined for the presence of thelyas in bioassays (Figure 4,5).

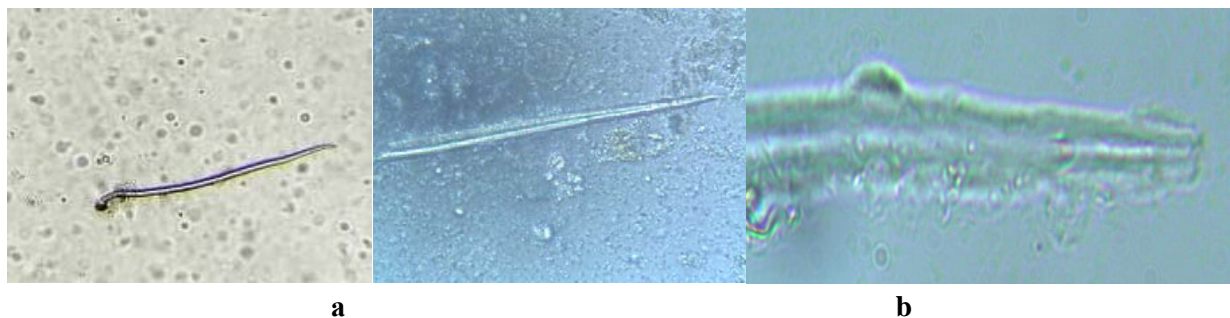


Figure 5 - *Thelazia* larvae under a light microscope x10 (a), x100 (b)

From Figure 5 it is clear that the larvae have a spherical cap and a beveled head end without thickening, which is characteristic of *Thelazia rhodesi*, which infects the conjunctival sac, the area of the third eyelid.

According to our research, it was revealed that the clinical picture of thelaziosis and Pink eye is identical (Figure 6), has a seasonal nature.

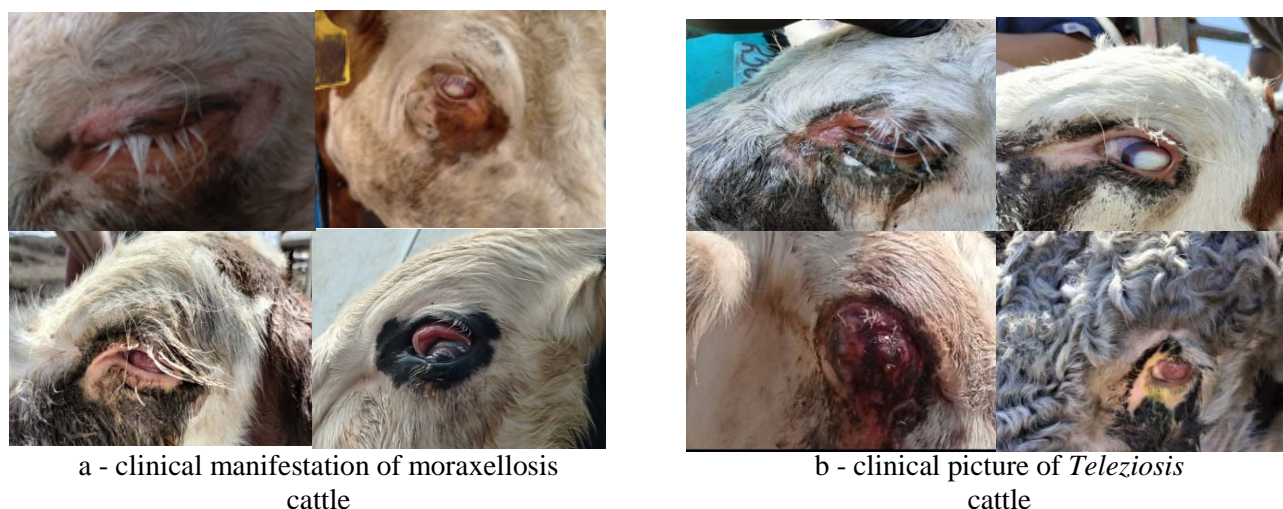


Figure 6 – Clinical picture of infectious and invasive keratoconjunctivitis in cattle

As can be seen from Figure 6, the clinical picture for infectious and invasive keratoconjunctivitis is similar. Clinical keratoconjunctivitis: a – cattle of an economic entity in Zhetysu, b – Akmola regions.

Conclusion

According to our research date, it was revealed that the clinical picture of thelaziosis and moraxellosis is identical and in both cases the vector-borne carriers are insects - *Musca domestica*, *Musca autumnalis*. Invasive and infectious keratoconjunctivitis can occur both simultaneously and separately from each other.

Pink eye and Thelaziosis of cattle were found in economic entities of the Akmola region, while in peasant farms of the Zhetysu and Kostanay regions only thelaziosis of cattle was detected.

When examined under a light microscope, nematode larvae were found in 224 samples, which amounted to 41.3%, in particular, 103 washouts from Zhetysu (55.1%), 112 samples from Akmola (44.9%) and 9 cases from Kostanay regions (90%).

Moraxella pathogen DNA was isolated in 15 cases out of 227 conjunctival swabs from the Akmola region, which amounted to 6.6%.

The use of a set of «PCR-Moraxella-RT» reagents showed that in 15 positive samples identified as *Moraxella bovoculli* (100%), *Moraxella ovis* was detected in 33.3%, and *Moraxella bovis* - 6.7%.

During a microscopic examination of conjunctival swabs from the same animals, thelasia were found in 224 samples, which amounted to 43.1%.

Laboratory studies of samples from the nasal cavities by RT PCR did not identify *Moraxella* DNA, just as thelesia leucinae were not detected by microscopy.

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 “Develop and offer for production a multiplex polymerase chain reaction (PCR) in real time for identifying pathogens of infectious bovine keratoconjunctivitis”.

References:

1 Brown M.H., Brightman A.H., Fenwick B.W., Rider M.A. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *J Vet Intern Med*, 1998, Jul-Aug.; 12(4): 259-66. (doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02120.x. PMID: 9686385)

2 Postma G.C., Carfagnini J.C., Minatel L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2008, Nov.: 31(6): 449-58. (doi: 10.1016/j.cimid.2008.04.001. Epub 2008 Jun 2. PMID: 18514312)

3 Kneipp M. Defining and Diagnosing Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2021, Jul.; 37(2): 237-252. (doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.001. PMID: 34049656)

4 Jill Franks, An Update On Bovine Pinkeye Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye) in Beef Cattle. (www.addl.purdue.edu/newsletters.2003,summer/bovpinkeye.shtml)

5 Woods B.J., Millman S.T., da Silva N.A., Dewell R.D., Parsons R.L., Wang C., O'Connor A.M. Pain and sickness behavior associated with corneal lesions in dairy calves. *F1000Res.* 2015, Aug., 11; 4:546. (doi: 10.12688/f1000research.6649.1. PMID: 26949517; PMCID: PMC4758373)

6 Angelos J.A., Elizalde P., Griebel P. Bovine Immune Responses to *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* Following Vaccination and Natural or Experimental Infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2021, Jul.; 37(2): 253-266. (doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.002. PMID: 34049657)

7 Kozikov I.N. Sovremennyy podkhod k lecheniyu infektsionnogo keratokonyunktivita u krupnogo rogatogo skota. *Effektivnoye zhivotnovodstvo.* 2019. №5 (153). (<https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyy-podhod-k-lecheniyu-infektsionnogkeratokonyunktivita-u-krupnogo-rogatogo-skota>)

8 Loy J.D., Hille M., Maier G., Clawson M.L. Component Causes of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis - The Role of *Moraxella* Species in the Epidemiology of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2021, Jul.; 37(2): 279-293. (doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.004. PMID: 34049659)

9 Trout Fryxell R. T., Moon R.D., Boxler D.J., Watson D.J., Face Fly (Diptera: *Muscidae*) - Biology, Pest Status, Current Management Prospects, and Research Needs. *Journal of Integrated Pest Management.* Vol. 12, Issue 1, 2021 (5). (<https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa020>)

10 Ahmed Seid. Review on Infectious Bovine Keratoconjunctivitis and its Economic Impacts in Cattle. *Dairy and Vet Sci J.* 2019; 9(5): 555774. (DOI:10.19080/JDVS.2019.09.555774)

11 Holzhauser M., Visser I.J., van Maanen K. Infectieuze keratoconjunctivitis bij runderen, overzicht aan de hand van kliniek- en laboratoriumonderzoek op vier bedrijven [Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cows, clinical and lab review at four farms]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2004, Aug. 15; 129(16): 526-9. (Dutch. PMID: 15347189)

12 Boranbayeva K.E., Zamanbekov N.A., Sattarova R.S., Spiridonov G.N., Zhylgeldiyeva A.A., Turzhigitova Sh. B. Comparative Pharmacotherapeutic effectiveness of Therapeutic Ointments in infectious Keratoconjunctivitis in cattle. *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 2023; 16(1):46-4. (doi: 10.52711/0974-360X.2023.00009, <https://rjptonline.org/AbstractView.aspx?PID=2023-16-1-9>)

13 Ivanov N.P., Bakiyeva F.A., Namet A.M., Sattarova R.S., Issakulova B.Z., Akmyrzaev N.Z. The epizootic situation of cattle moraxellosis in several economic entities of the Republic of Kazakhstan. *Vet World.* 2021, May; 14(5): 1380-1388. (doi: 10.14202/vetworld.2021.1380-1388. Epub 2021 May 30. PMID: 34220144; PMCID: PMC8243689)

14 Byulleten normativnykh i metodicheskikh dokumentov gossanepidnadzora. 1.2. Gigiyena. toksikologiya. sanitariya. Poryadok otbora prob dlya vyyavleniya i identifikatsii nanomaterialov v laboratornykh zhivotnykh. Vypusk 1 (43). mart 2011. str. 115-143.

15 Tazayan A.N. Obshchaya parazitologiya i gelmintologiya: uchebnoye posobiye/Donskoy GAU. – Persianovskiy: Donskoy GAU. 2019, (<https://e.lanbook.com/book/134370>)

16 Glazunova L.A., Glazunov Yu.V. Rasprostraneniye telyazioza krupnogo rogatogo skota i vidovoy sostav telyaziy v lesostepnoy zone Severnogo Zauralia. *Vestnik KrasGAU.* 2018. №4 (139). (<https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-telyazioza-krupnogo-rogatogo-skota-i-vidovoy-sostav-telyaziy-v-lesostepnoy-zone-severnogo-zauralya>)

17 (Pinkeye) in Beef Cattle. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://transylvania.ces.ncsu.edu/wpcontent/uploads/2017/07/Livestock-News-Summer-2017-Transylvania-County.pdf? fwd=no> (дата обращения 29.11.2023г)

18 DeBower, Dane and Thompson, James R. (1997) "Infectious Bovine Keratoconjunctivitis," *Iowa State University Veterinarian: Vol. 59 : Iss. 1 , Article 11.* (chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://core.ac.uk/download/pdf/38907996.pdf>)

Р.С. САТТАРОВА^{1*}, В.М. СТРОЧКОВ¹, К.Е. БОРАНБАЕВА¹, Н.А. ЗАМАНБЕКОВ²
Ф.А. БАКИЕВА¹, К.М. ШЫНЫБАЕВ¹, М.С. ОСПАНОВА³, К. СМАН⁴,
Г.Н. СПИРИДОНОВ⁴

¹Қазақ ғылыми зерттеу ветеринария институты, Алматы, Қазақстан

²Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

³М.Ауезова атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан

⁴Абая атындағы Қазақ Ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

⁵Токсикологиялық, радиациондық және биологиялық қауіпсіздік федеральдық орталығы,
Казань, Ресей Федерациясы

*e-mail: ranosaitomarovna@gmail.ru

ІРІ ҚАРА МАЛДЫҢ ІНДЕТТІ ЖӘНЕ ИНВАЗИВТІ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТІН САЛЫСТЫРМАЛЫ БАЛАУ

Түйін

Мақалада ірі қара малдағы індетті және инвазивті кератоконъюнктивитінің салыстырмалы зерттеу нәтижелері берілген. Ақмола, Жетісу, Түркістан және Қостанай облыстарының шаруақожалықтарындағы ірі қара малдан 542 биосынама (көз жуындысы) зерттелді. Ірі қара мал моракселлезінің үш қоздырғышы – *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis*, *Moraxella bovoculi* анықтау үшін «НУ-Мораксела- ПТР» реагенттерінің жинағымен нақты уақыттағы полимеразды тізбекті реакция жүргізілді. Ақмола облысынан алынған 15 *Moraxella bovoculi* (100%) оң биосынамаларының 33,3% *Moraxella ovis*, 6,7% *Moraxella bovis* құрады. Осы 542 көз жуындысын микроскопиялық зерттеу нәтижесінде 224 сынамадан телязия дернәсілдері анықталып, 43,1% құрады.

Кілтті сөздер: кератоконъюнктивит, *Moraxella*, *Thelasia*, ірі қара мал.

МРНТИ: 68.41.05, 68.41.53, 68.41.55

Р.С. САТТАРОВА^{1*}, В.М. СТРОЧКОВ¹, К.Е. БОРАНБАЕВА¹, Н.А. ЗАМАНБЕКОВ²,
Ф.А. БАКИЕВА¹, К.М. ШЫНЫБАЕВ¹, М.С. ОСПАНОВА³, К. СМАН⁴,
Г.Н. СПИРИДОНОВ⁵

¹Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

³Южноказахстанский университет им.М.Ауезова, Шымкент, Казахстан

⁴Казахский Национальный педагогический университет им.Абая, Алматы, Казахстан

⁵Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической
безопасности, Казань, Российская Федерация

*e-mail: ranosaitomarovna@gmail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ И ИНВАЗИОННОМ КЕРАТОКОНЬЮНКТИВИТАХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.09

Аннотация

В статье приводятся результаты сравнительных исследований при инфекционном и инвазионном кератоконъюнктивитах крупного рогатого скота за 2023 год. Было исследовано 542 конъюнктивальных смывов крупного рогатого скота хозяйствующих субъектов Акмолинской, Жетысуской, Туркестанской и Костанайской областей. Полимеразно-цепная реакция в режиме реального времени проводилась набором реагентов «ПЦР-Моракселла-РВ» для выявления трех возбудителей моракселлеза - *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis*, *Moraxella bovoculi*. В 15 положительных пробах из Акмолинской области, идентифицированных как *Moraxella bovoculi*

(100%), 33,3% опознаны как *Moraxella ovis*, а 6,7% – *Moraxella bovis*. При микроскопическом исследовании конъюнктивальных смывов от этих же животных, теляти были обнаружены в 224 пробах, что составило 41,3%.

Ключевые слова: кератоконъюнктивит, *Moraxella*, *Thelasia*, крупный рогатый скот.

Болезни органов зрения крупного рогатого скота быстро распространяются в крупных животноводческих комплексах со скученным содержанием животных. Заразные болезни глаз животных наносят животноводческим хозяйствам значительный экономический ущерб [1-4] за счет преждевременной выбраковки животных, потери их племенной ценности, снижения удоев и прироста живой массы тела, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и специальных ветеринарных мероприятий [5,6]. Наиболее высокий процент заболеваемости наблюдается у телят в возрасте 1–6 мес. (50–70%). В группах дорастивания и откорма, особенно когда скот находится на площадках с большой плотностью поголовья, заболевание регистрируется до 30%. Кератоконъюнктивит среди дойного стада колеблется в пределах 10-12% [7].

На животноводческих комплексах болезни глаз животных регистрируются круглогодично, но наиболее массово – в летние месяцы, когда крупный рогатый скот находится на пастбище и подвержен нападению насекомых (*Musca domestica*, *Musca autumnalis*) – переносчиков возбудителя [8,9]. Заболевание характеризуется слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, серозно-гнойным истечением, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобула или кератоконуса, частичной или полной потерей зрения пораженного глаза животного [10-13].

Инфекционный кератоконъюнктивит моракселлезной этиологии или «pink eye» (розовый глаз) крупного рогатого скота – инфекционное заболевание, характеризующееся поражением глаз, проявляющимся слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобула или кератоконуса, частичной или полной потерей зрения [10,11].

Телязиоз – гельминтозное заболевание крупного рогатого скота, проявляющееся конъюнктиво-кератитами, вызванное паразитированием нематод подотряда *Spirurata*, семейства *Thelaziidae* в протоках слезной железы, слезно-носовом канале, под третьим веком и в конъюнктивальном мешке [16]. Заболевание остро протекает у молодняка и, как правило, осложняется секундарной инфекцией, которая сопровождается кератоконъюнктивитами различных форм, в т.ч. моракселлезом.

Цель исследования – сравнительная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота двумя методами: на паразитарную, путем микроскопии смывов и на бактериальную инфекцию – полимеразной цепной реакцией в реальном времени.

Материалы и методы исследования

Биологический материал для исследования получили путем ирригации конъюнктивы и ноздрей с использованием стерильных тампонов. Забор образцов проводился по протоколу отбора проб [14]. При этом проводили клинический осмотр как импортированного, так и местного крупного рогатого скота различных половозростных групп и разных пород (Абердино-Ангусы, Герефорды, Голштинофризы, Казахская белоголовая, Аулиекольская и местные беспородные животные). При клиническом исследовании крупного рогатого скота на инфекционный кератоконъюнктивит обращали внимание на общее состояние животного, наличие (отсутствие) слезотечения, светобоязни, гиперемии сосудов конъюнктивы, блефароспазма, иридооспазма, серозно-слизистых или серозно-гнойных истечений из глаз, помутнения и (или) изъязвления роговицы.

Испытанию подверглись 542 пробы от пораженных глаз крупного рогатого скота. Лабораторные исследования проводились микроскопированием [15] конъюнктивальных

смывов на микроскопе MEIJI TECHNO (пр-во Япония) с цифровой фотокамерой при увеличении x10 и x100. и с применением набора реагентов «ПЦР-Моракселла-РВ» для выявления возбудителя моракселлеза методом мультиплексной полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени, разработанным учеными Казахского научно-исследовательского ветеринарного института (СТ ТОО 071240018450-002-2023).

Постановка ПЦР выполнялась по разработанному протоколу в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Протокол амплификации ПЦР РВ

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин	-	1
2	95	10 сек	-	40
	56	20 сек	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	20 сек	-	

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала – анализировались с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией производителя к прибору. Результат амплификации ДНК *Moraxella bovoculli* – детектируется по каналу FAM/Green, ДНК *Moraxella ovis* – по каналу JOE/Yellow, ДНК *Moraxella bovis* – по каналу ROX/Orange.

Учет результатов ПЦР-анализа проводился по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Сt» для исследуемого образца).

Результаты и обсуждение

За период исследования, с мая 2021 года по октябрь 2023 года, было осмотрено 2971 голова крупного рогатого скота разных пород половозрастных групп. Из них выявлено больных с клиническими признаками кератоконъюнктивита 214 особей, от которых были отобраны 542 пробы. Отбору конъюнктивальных смывов и смывов из ноздрей подверглись животные Ескельдинского (66 пробы), Саркандского (78 проб), Алаколского (43 пробы) районов Жетысуской области, Арысского района Туркестанской области (96 проб), крупный рогатый скот крестьянских хозяйств (249 проб) Астраханского района Акмолинской области и «Обаған ауылы» Костанайской области (10 проб). Всего изучено 542 (смывы из конъюнктивы и из ноздрей) пробы (таблица1), которые были подвергнуты исследованию полимеразно-цепной реакцией в реальном времени и микроскопированием на наличие личинок нематод.

Таблица 1 – Сведения по отбору биопроб

Наименование		Кол-во исс-х жив-х	Кол-во клин- и больн ых жив-х	Количество исследованных проб				
областей	районов			смыв	конъюнктив		носовая полость	
					левая	правая	левая	правая
Жетысуская	Ескельды	172	22	66	26	17	10	13
	Сарканд	144	26	78	19	19	24	16
	Алакол	409	24	43	15	7	14	7
Туркестанская	Арыс	127	24	96	24	24	24	24
Акмолинская	Астрахан	2119	118	249	129	98	10	12
Костанайская	Алтынсарин	-	-	10	4	6	-	-
Итого		2971	214	542	217	171	82	72

Биопробы из слизистых носовой полости также старались брать со стороны большого глаза и из ноздрей с серозными истечениями, т.к. *Thelazia rhodesi* поражают конъюнктивальный мешок, область третьего века, а *T. gulosa* и *T. skrjabini* обитают в слезно-носовом канале и слезной железе. В зависимости от клинического состояния одного животного с признаками конъюнктивита брали по 1 или 2, иногда 3, максимум по 4 пробы, т.е., если у животного есть клинические поражения в обоих глазах и наблюдались истечения из ноздрей, брали пробы из каждого глаза и ноздри одновременно. Результаты исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Сведения по распространению инфекционного и инвазионного кератоконъюнктивита среди крупного рогатого скота в некоторых областях РК

Наименование		Результаты лабораторных исследований								
		микроскопия					ПЦР РВ			
		смыв	конъюнктив		носовая полость		конъюнктив а		носовая полость	
иссл-о	полож		иссл-о	полож	иссл-о	ПОЛ ОЖ	иссл-о	ПОЛ ОЖ		
Жетысу	Ескелді	66	43	43	23	-	43	-	-	-
	Сарканд	78	38	38	40	-	38	-	-	-
	Алакол	43	22	22	21	-	22	-	-	-
Туркестан	Арыс	96	48	0	48	-	48	-	-	-
Акмола	Астрахан	249	227	112	22	-	227	15	-	-
Костанай	Алтынсарин	10	10	9	-	-	10	-	-	-
Итого		542	388	224	154	0	388	15	154	0

По данным таблицы 2, из исследованно 187 проб из крестьянских хозяйств Жетысуской области нематоды были обнаружены в 103 конъюнктивальных смывах. Аналогичная картина наблюдалась при исследовании 249 проб из Акмолинской области (112 положительных проб) и Костанайской области (9 положительных проб), тогда как в 154 смывах из носовой полости телязии не обнаружены.

Полимеразно-цепной реакцией в реальном времени ДНК культур моракселл выявлены только из Акмолинской области, т.е. из 227 конъюнктивальных смывов 15 реагировали положительно, в частности, в 15 положительно реагировавших пробах на *Moraxella bovoculli*, 5 проб было идентифицировано как *Moraxella bovoculli* и *Moraxella ovis* и одна проба - на *Moraxella bovoculli*, *Moraxella ovis* и *Moraxella bovis* (рисунки 2 - 4).

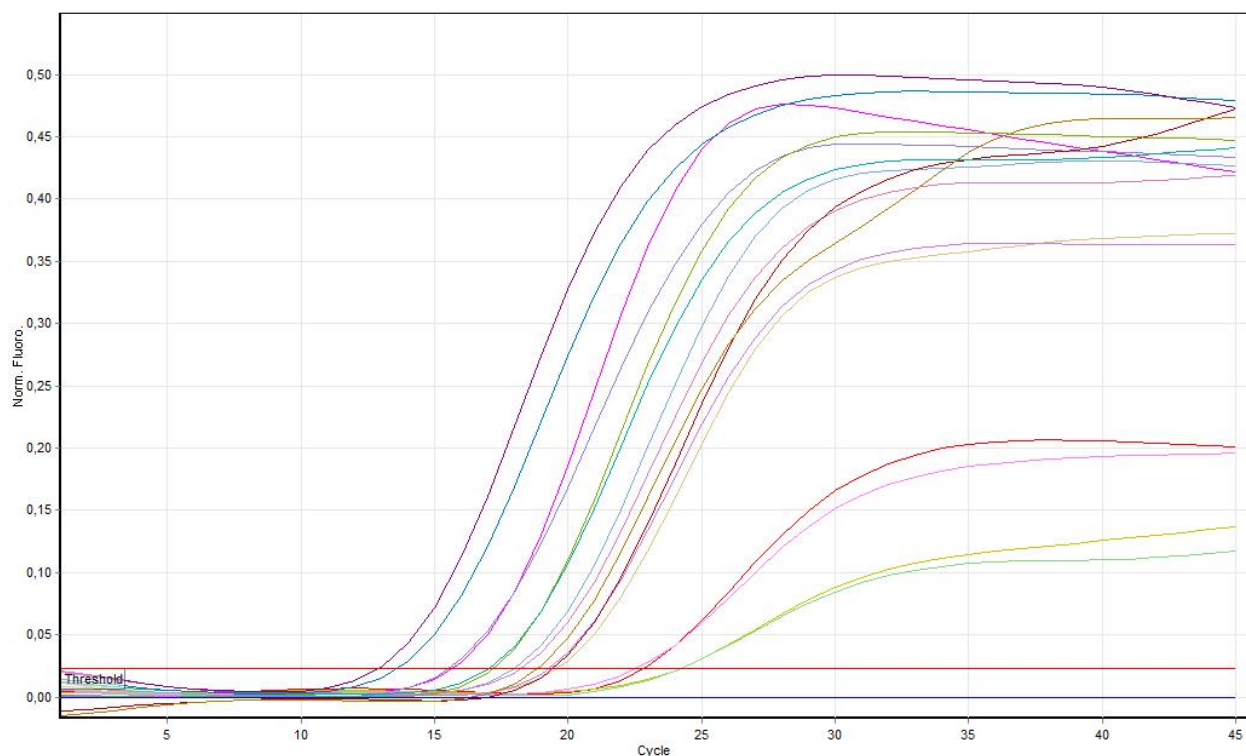


Рисунок 2 - Кривые амплификации для полевых образцов по каналу Green *M. Bovoculi*

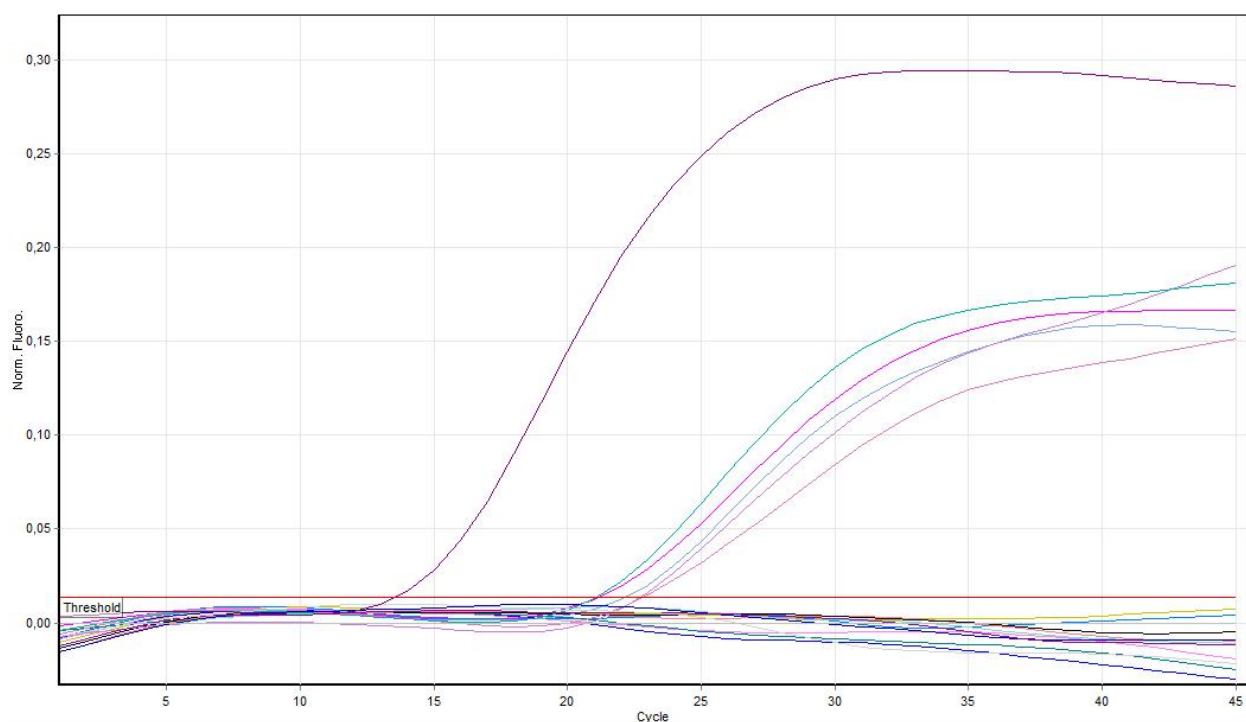


Рисунок 3 - Кривые амплификации для полевых образцов по каналу Yellow (*M. ovis*)

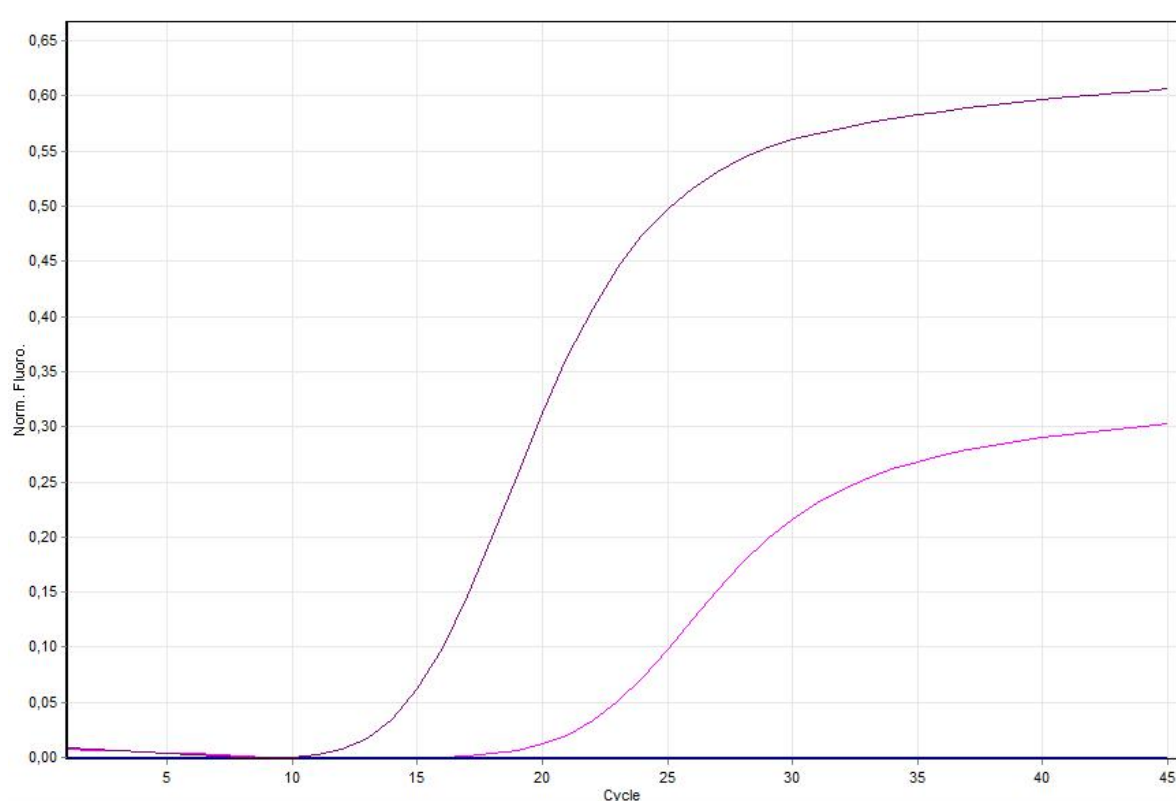


Рисунок 4 - Кривые амплификации для полевых образцов по каналу Orange (*M. bovis*)

Телязии вызывают механическое раздражение конъюнктивы глаз, повреждая роговицу, слизистую оболочку, выделяя продукты обмена веществ, снижая иммунитет, протекая с проявлениями клинической картины как при моракселлёзе. С целью дифференциации моракселлёза, исследовали смывы на наличие телязий в биопробах (рисунки 4,5).

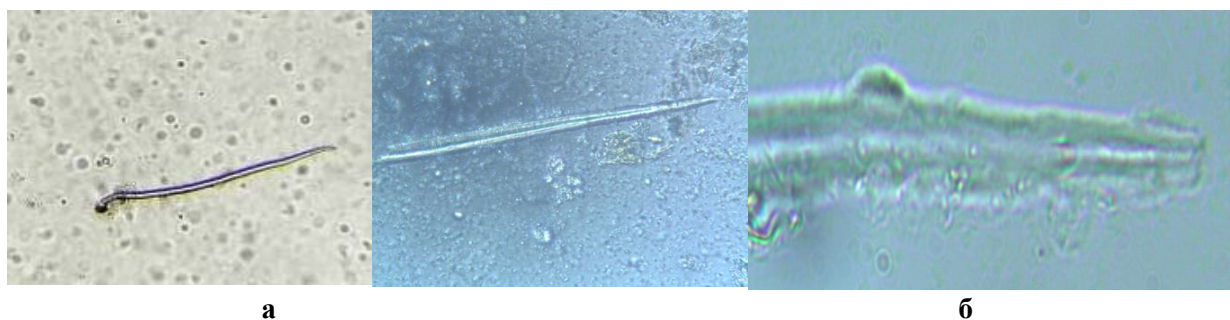


Рисунок 5 - Личинки телязии под световым микроскопом x10 (а), x100 (б)

Из рисунка 3 видно, что личинки имеют шаровидный чехлик и скошенный без утолщений головной конец, что характерно для *Thelazia rhodesi*, которые поражают конъюнктивальный мешок, область третьего века.

По данным наших исследований выявлено, что клинические картины телязиоза и моракселлёза очень схожи (рисунок 6), имеют сезонный характер.



а - клиническое проявление моракселлеза крупного рогатого скота

б - клиническая картина телязиоза крупного рогатого скота

Рисунок 6 – Клиническая картина при инфекционном и инвазионном кератоконъюнктивитах крупного рогатого скота. Клиническая картина кератоконъюнктивита а – крупный рогатый скот хозяйствующего субъекта Жетысуской, б – Акмолинской областей

Как видно из рисунка 6, клинические картины при инфекционном и инвазионном кератоконъюнктивите схожие.

Заключение

По данным наших исследований выявлено, что клинические картины телязиоза и моракселлеза идентичны. В обоих случаях трансмиссивными переносчиками являются инсекты – *Musca domestica*, *Musca autumnalis* [16,17]. Инвазионный и инфекционный кератоконъюнктивиты могут протекать как одновременно, так и обособленно друг от друга. Моракселлез и телязиоз крупного рогатого скота обнаружены в хозяйствующих субъектах Акмолинской области, тогда как в крестьянских хозяйствах Жетысуской и Костанайской областей был установлен только телязиоз КРС.

При исследовании под световым микроскопом личинки нематод были обнаружены в 224 пробах, что составило 41,3%, в частности, в 103 смывах от КРС Жетысуской (55,1%), 112 пробах Акмолинской (44,9%) и 9 случаях из Костанайской областей (90%).

ДНК патогенов моракселл был выделен в 15 случаях из 227 конъюнктивальных смывов из Акмолинской области, что составило 6,6%.

Использование набора реагентов «ПЦР-Моракселла-РВ» показало, что в 15 положительных пробах, идентифицированных как *Moraxella bovoculli* (100%), *Moraxella ovis* выявлено в пяти пробах (33,3%), а *Moraxella bovis* – в одной пробе (6,7%).

При исследовании проб из носовой полости методом ПЦР РВ ДНК моракселл не идентифицированы, личинки телязий из этих же проб также не были обнаружены.

Финансирование

Работа выполнена в рамках ПЦФ МСХ РК (2021-2023 гг.) по проекту «Разработать и предложить для производства мультиплексную полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени для выявления возбудителей инфекционного кератоконъюнктивита КРС».

Литература:

1 Brown M.H., Brightman A.H., Fenwick B.W., Rider M.A. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *J Vet Intern Med*, 1998, Jul-Aug.; 12(4): 259-66. (doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02120.x. PMID: 9686385)

2 Postma G.C., Carfagnini J.C., Minatel L. *Moraxella bovis* pathogenicity: an update. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2008, Nov.: 31(6): 449-58. (doi: 10.1016/j.cimid.2008.04.001. Epub 2008 Jun 2. PMID: 18514312)

3 Kneipp M. Defining and Diagnosing Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2021, Jul.; 37(2): 237-252. (doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.001. PMID: 34049656)

4 Jill Franks, An Update On Bovine Pinkeye Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye) in Beef Cattle. (www.addl.purdue.edu/newsletters.2003,summer/bovpinkeye.shtml)

5 Woods B.J., Millman S.T., da Silva N.A., Dewell R.D., Parsons R.L., Wang C., O'Connor A.M. Pain and sickness behavior associated with corneal lesions in dairy calves. *F1000Res.* 2015, Aug., 11; 4:546. (doi: 10.12688/f1000research.6649.1. PMID: 26949517; PMCID: PMC4758373)

6 Angelos J.A., Elizalde P., Griebel P. Bovine Immune Responses to *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* Following Vaccination and Natural or Experimental Infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2021, Jul.; 37(2): 253-266. (doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.002. PMID: 34049657)

7 Козиков И.Н. Современный подход к лечению инфекционного кератоконъюнктивита у крупного рогатого скота. Эффективное животноводство. 2019, №5 (153). (<https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennyy-podhod-k-lecheniyu-infektsionnogkeratokonyunktivita-u-kрупnogo-roगतого-skota>)

8 Loy J.D., Hille M., Maier G., Clawson M.L. Component Causes of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis - The Role of *Moraxella* Species in the Epidemiology of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2021, Jul.; 37(2): 279-293. (doi: 10.1016/j.cvfa.2021.03.004. PMID: 34049659)

9 Trout Fryxell R. T., Moon R.D., Boxler D.J., Watson D.J., Face Fly (Diptera: *Muscidae*) - Biology, Pest Status, Current Management Prospects, and Research Needs. *Journal of Integrated Pest Management.* Vol. 12, Issue 1, 2021 (5). (<https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa020>)

10 Ahmed Seid. Review on Infectious Bovine Keratoconjunctivitis and its Economic Impacts in Cattle. *Dairy and Vet Sci J.* 2019; 9(5): 555774. (DOI:10.19080/JDVS.2019.09.555774)

11 Holzhauser M., Visser I.J., van Maanen K. Infectieuze keratoconjunctivitis bij runderen, overzicht aan de hand van kliniek- en laboratoriumonderzoek op vier bedrijven [Infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in cows, clinical and lab review at four farms]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2004, Aug. 15; 129(16): 526-9. (Dutch. PMID: 15347189)

12 Boranbayeva K.E., Zamanbekov N.A., Sattarova R.S., Spiridonov G.N., Zhylgeldiyeva A.A., Turzhigitova Sh. B. Comparative Pharmacotherapeutic effectiveness of Therapeutic Ointments in infectious Keratoconjunctivitis in cattle. *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 2023; 16(1):46-4. (doi: 10.52711/0974-360X.2023.00009, <https://rjptonline.org/AbstractView.aspx?PID=2023-16-1-9>)

13 Ivanov N.P., Bakiyeva F.A., Namet A.M., Sattarova R.S., Issakulova B.Z., Akmyrzaev N.Z. The epizootic situation of cattle moraxellosis in several economic entities of the Republic of Kazakhstan. *Vet World.* 2021, May; 14(5): 1380-1388. (doi: 10.14202/vetworld.2021.1380-1388. Epub 2021 May 30. PMID: 34220144; PMCID: PMC8243689)

14 Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора. 1.2. Гигиена, токсикология, санитария, Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных, Выпуск 1 (43), март 2011, стр. 115-143.

15 Тазаян А.Н. *Общая паразитология и гельминтология: учебное пособие/Донской ГАУ.* – Персиановский: Донской ГАУ, 2019, (<https://e.lanbook.com/book/134370>)

16 Глазунова Л.А., Глазунов Ю.В. Распространение телязиоза крупного рогатого скота и видовой состав телязий в лесостепной зоне Северного Зауралья. *Вестник КрасГАУ.* 2018. №4 (139). (<https://cyberleninka.ru/article/n/rasprostranenie-telyazioza-kрупnogo-roगतого-skota-i-vidovoy-sostav-telyaziy-v-lesostepnoy-zone-severnogo-zauralya>)

17 (Pinkeye) in Beef Cattle. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/<https://transylvania.ces.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/07/Livestock-News-Summer-2017-Transylvania-County.pdf?fwd=no> (дата обращения 29.11.2023г)

18 DeBower, Dane and Thompson, James R. (1997) "Infectious Bovine Keratoconjunctivitis," *Iowa State University Veterinarian*: Vol. 59 : Iss. 1 , Article 11. (chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/<https://core.ac.uk/download/pdf/38907996.pdf>)

IRSTI: 68.03.07: 68.47.37

I.I. TEMRESHEV^{1*}, B.K. KOPZHASSAROV¹, Z.B. BEKNAZAROVA¹,
A.M. SARBASSOVA¹, A.K. SADANOV², E.T. ISMAILOVA², A.E. MOLZHIGITOVA²,
R.V. YAKOVLEV³

¹Kazakh Research Institute of Plant Protection and Quarantine named after Zhazken
Zhyembayev, Almaty, Kazakhstan

²Research and Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

³Altai State University, Barnaul, Russian Federation

*e-mail: temreshev@76mail.ru

**RED BUD BORER *RESSELIELLA OCULIPERDA* (RÜBSAAMEN, 1893) (DIPTERA,
CECIDOMYIIDAE) – A NEW VECTOR OF FIRE BLIGHT (*ERWINIA AMYLOVORA*)
OF FRUIT CROPS IN KAZAKHSTAN**

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.10

Abstract

Red bud borer *Resseliella oculiperda*, a pest of many fruit crops, is a new vector of the causative agent of bacterial fruit blight *Erwinia amylovora* in Kazakhstan. It was confirmed using PCR analysis of its larvae and puparia collected from apple trees of the Aport variety in two peasant farms at different times. The spread of infection with the help of *R. oculiperda* can go in several ways: 1) with the development of gall midge larvae in the branches of infected trees, the imago, after emerging from the puparium, can carry the spores of the pathogen on itself to other plants; 2) when females lay eggs in tree branches (females lay eggs in fresh mechanical damage (wounds, cracks, and scratches) of the bark on the trunk, shoots and branches, buds and eyes); 3) when gall midge larvae make passages during feeding, the infection can penetrate the resulting lesions with wind, rain, and other insects penetrating the passages of larvae; 4) introduction of bacteria by gall midge larvae from contaminated soil. In Kazakhstan, methods for controlling the number of budding gall midges have not been developed, and at present the actual distribution of the pest in the territory of the republic is unknown. Since *R. oculiperda* is a vector of such a dangerous quarantine disease as the bacterial blight of fruit, further research in this direction is necessary to clarify the missing information.

Keywords: *Resseliella oculiperda*, *Erwinia amylovora*, vector.

The species composition and significance of insects in the spread of fire blight of fruit crops (*Erwinia amylovora* (Burrill, 1882) Winslow et al., 1920) has been studied in world practice for more than 100 years. There is an opinion that pollinators (Hymenoptera, Diptera, etc.) and sucking pests (various types of Hemiptera) play the greatest role [1-3]. According to some reports, the bees do not feed on the bacterial exudate that escapes, but they can carry *E. amylovora* between flowers. There are conflicting data on this. According to some, their role in the spread of fire blight on fruit crops may be overestimated [3]. Thus, bacteria survived for 15 days on the body of honey bees and were most abundant on the abdomen compared to other parts of the body such as the lip, wings, and hind legs [4]. In the digestive system of honey bees, *E. amylovora* persisted for 7 days, and bacteria were found in the excrement for 3 days after contact. There is an assumption that various species of Hemiptera, after moving along the bacterial exudate, can subsequently carry bacteria during feeding, piercing the stems, leaves, and fruits of host plants, but this has not been fully elucidated. Separate information is available on Diptera. It was noted that fruit flies *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 readily feed on bacterial exudate; after which the insects retained viable bacteria for at least 7 days [5]. The possibility of transmission of fire blight of fruit crops by the Mediterranean fruit fly (or Medfly) *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824), a dangerous quarantine pest of fruit crops, has been experimentally proven. *E. amylovora* can survive for at least 8 days in the digestive tract of the Medfly and up to 28 days on the body surface [6]. The possibility of transferring fire blight of fruit crops by another dangerous polyphagous pest,

the seedcorn maggot *Delia platura* (Meigen, 1826), has also been proven. These flies can carry bacteria on their bodies for at least 5 days [7]. The species composition and role of insects as agents of the spread of *E. amylovora* in Kazakhstan have not been clarified, which determines the relevance of this work. One of these insects is the red bud borer, or red bud maggot.

Red bud borer (red bud maggot) (*Resseliella oculiperda* (Rübsaamen, 1893) = *Thomasiniana oculiperda* (Rübsaamen, 1893) = *Diplosis oculiperda* Rübsaamen, 1893) belongs to the family of gall midges (Cecidomyiidae) of the order Diptera. It is a pest of many fruit crops. Damages pear, apple, quince, cherry plum, apricot, cherry, sweet cherry, peach, plum, bird cherry, hawthorn, blackthorn, dogwood, figs, wild roses, roses, etc. Females lay eggs in fresh mechanical damage (wounds, cracks, and scratches) of the bark on the trunk, shoots and branches, buds, and eyes. Quite often, oviposition occurs at the grafting sites during budding (hence the Russian name of the insect) and prevents the graft and rootstock from growing together. The larvae of this species, unlike other representatives of the gall family, do not form, or feed on plant tissues (cambium, etc.) of the trunk, branches, shoots, and buds of host plants, as well as wound secretions of the rootstock. They make longitudinal passages in the wood of the eye, which causes the death and drying of the scion. The death of budded ocelli as a result of the vital activity of gall midges on stone fruits ranges from 30% to 50%, and on pome fruits - from 15% to 30%. Reproduction is parthenogenetic, males not found. The larvae overwinter in the upper layers of the soil. During the growing season, 2-3 generations develop, overlapping with each other. The pest is included in the EPPO database [8]. The distribution of the ocellar midge covers Western Europe, and the middle and southern parts of Eastern Europe [8-11]. In Kazakhstan, it is an invasive species, introduced with planting material, and is currently recorded in the southeast of the country [12]. Based on the foregoing, *R. oculiperda* can presumably be a carrier of the causative agent of transferring fire blight of fruit crops.

Fire blight of fruit crops is a dangerous quarantine disease of fruit crops that causes significant economic damage in many countries of the world, including Kazakhstan. The infection affects more than 160 species of plants of the Rosaceae family, causing their rapid death [13-20]. Based on the above, the chosen direction of research is very relevant. The aim of the work was to find out the possibility of transmission of the bacterium *E. amylovora* by the red bud borer. In this regard, the tasks were set to collect material on this pest and to identify, using laboratory analysis, the presence of the causative agent of fire blight of fruit crops in it.

Materials and methods of research

The material was collected in apple orchards of fruit-growing farms in the Almaty region in 2023. During the monitoring surveys, the development of *R. oculiperda* on the branches and trunks of apple trees of the Apport variety was noted, and it was decided to check this species for the presence of a pathogen with a bacterial burn of fruit. The following techniques were used in the research:

1. The method of accounting under the bark. After removing the bark, they collect and count the number of found larvae and adults of insects on a pallet (50x20 cm) on tree trunks. It can be used a special small net, which fits completely with its hoop to the surface of the substrate, that does not allow insects to slip into the gap between the net and the substrate. The method applies to the collection of xylophagous beetles, bugs, some parasitic hymenoptera, certain types of spiders, centipedes, pseudoscorpions, etc.

2. Sampling method for bacterial fruit burn. In compliance with all antiseptic requirements, 3-4 samples were taken from each diseased tree. When sampling, the affected parts of plants were cut out with the capture of healthy tissue. One sample consisted of various plant parts collected from the same tree. Each sample included inflorescences, ovaries, leaves, fruits, young shoots, bark from skeletal branches, and trunk. The selected samples were placed in filter paper bags along with a label indicating the region, farm, crop, variety, age, area, and date of sampling. The selected samples in filter bags were stored in a refrigerator until the etiology of the disease was established. The same method was used to collect samples of larvae and puparia of the budding midge.

3. Identification of *E. amylovora* by molecular genetic methods. Isolation of DNA. DNA was isolated from plant samples using GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0792 (ThermoFisher, USA), and from bacteria using GeneJET Genomic DNA Purification Mini Kit #K0722 (ThermoFisher, USA), plasmids were purified using GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0503 (ThermoFisher, USA) according to the instructions provided by the manufacturer of these reagents. To determine the quality and quantity of isolated DNA, agarose gel electrophoresis was performed. The results of electrophoresis were analyzed using a gel-documenting system with a Quantum-ST5 transilluminator, Vilber Lourmat.

Photographs of larvae and puparia of the red bud borer were taken with a Redmi 7 camera.

Coordinates of fruit-growing peasant farms where the research was carried out:

- 1) PF "Olzhas", N 43°09'32.6" E 76°33'33.8";
- 2) PF "Alatau", N 43°10'76.1" E 76°43'73.4".

Results and discussion

In total, 6 samples of larvae and puparia of the red bud borer were collected, 4 in the Alatau farm, and 2 in the Olzhas farm (Figure 1).

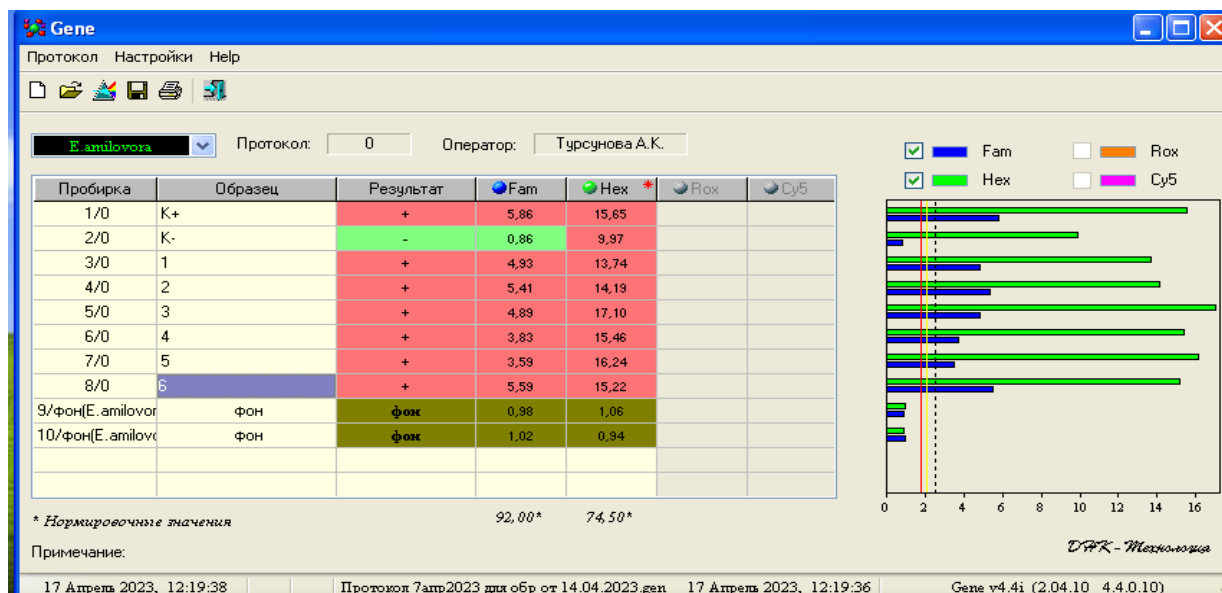


Figure 1 - Larvae (A) and puparia (B) of the red bud borer *Resseliella oculiperda*.

As a result of the PCR analysis of larvae and puparia of red bud borer *R. oculiperda* collected at different times, it was found that *E. amylovora* DNA is present in all samples (Figure 2).

Identification of isolated strains of phytopathogens of *Erwinia amylovora* was carried out by FLASH-PCR.

Amplification was carried out on the device - "Tertsik" using a set of reagents PCR amplification of the DNA of *Erwinia amylovora* by Agrodiagnostics LLC, developed based on the basic composition of the reaction system and the amplification mode. The detection was carried out on the "Jin" device (DNA Technology). The specialized fluorescence detector "Jin" is designed to record PCR results when using reagent kits based on the principles of fluorescence detection (FLASH format).



Note * Result «+» - the presence of the desired pathogen in the sample. Result «-» - absence of pathogen in the sample. «K+» - positive control, «K-» - negative control.

Figure 2 - Protocol for the study of samples of puparia and larvae of the red bud borer for the identification of *E. amylovora* by the molecular genetic method.

Thus, the red bud borer *R. oculiperda* is a new vector of the fire blight of fruit crops pathogen. The spread of *E. amylovora* by bud midges can occur in several ways:

1. With the development of red bud borer larvae in the branches of infected trees, the imago, after emerging from the puparium, can carry the spores of the pathogen on itself to other plants;
2. When female of red bud borer lay eggs in tree branches (as mentioned above, females lay eggs in fresh mechanical damage (wounds, cracks, and scratches) of the bark on the trunk, shoots and branches, buds, and eyes);
3. When larvae of red bud borer lay passages during feeding, the infection can penetrate the resulting lesions with wind, rain, and other insects penetrating the passages of larvae;
4. Introduction of bacteria by larvae of red bud borer from contaminated soil (as mentioned above, the larvae overwinter in the upper layers of the soil).

There may be some other ways of transferring the causative agent of fire blight of fruit crops by red bud borer, but so far, they are unknown. It should be noted that in Kazakhstan, methods for controlling the number of *R. oculiperda* have not been developed. In foreign sources, to combat it, it is recommended to spray during the growing season with chemical insecticides Ditox k.e., Ciperus k.e., Fufanon k.e., Mospilan r.p., Calypso s.k., Sumition k.e., Hloviss s.k., Dursban s.k., Zolon k.e., Lannat r.k., Pirineks k.e., and the biological product Bitoxibacillin p., as well as dressing the seeds before sowing with the preparations Imidalit TPS and Iskra M, c.e. As an agrotechnical method, the hilling of oculants immediately after inoculation is recommended. However, these preparations and methods have not been tested in our country. Also, the actual distribution of the pest in the territory of the republic is currently unknown. Given that the bud midge is a carrier of such a dangerous quarantine disease as fire blight of fruit crops, it is necessary to clarify this information in the future.

Conclusion

Red bud borer, a pest of many fruit crops, is a new carrier of the fire blight of fruit crops pathogen in Kazakhstan. This was confirmed by PCR analysis of its larvae and puparia collected in 2 peasant farms at different times on apple trees of the Aport variety. The spread of infection with *R. oculiperda* can proceed in several ways: 1) with the development of red bud borer in the branches of infected trees, the imago, after emerging from the puparium, can carry the spores of the pathogen on itself to other plants; 2) when females lay eggs in tree branches (females lay eggs

in fresh mechanical damage (wounds, cracks, and scratches) of the bark on the trunk, shoots and branches, buds and eyes); 3) when larvae of red bud borer make passages during feeding, the infection can penetrate the resulting lesions with wind, rain, and other insects penetrating the passages of larvae; 4) introduction of bacteria by larvae of red bud borer from contaminated soil (as mentioned above, the larvae hibernate in the upper soil layers). In Kazakhstan, methods for controlling the number of red bud borer have not been developed, and the actual distribution of the pest in the territory of the republic is currently unknown. Since *R. oculiperda* is a vector of such a dangerous quarantine disease as fire blight of fruit crops, this information needs to be clarified in the future. In microbiological studies, based on the results of the work carried out using PCR analysis, it was revealed that DNA of *Erwinia amylovora* was found in all samples of larvae and puparia of the red bud borer *R. oculiperda*.

Funding

The work was carried out within the framework of the project funded by Committee of the Science of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan BR18574022 "Microbial preparations to combat of fire blight of fruit crops".

References:

- 1 Thomson S.V. *Epidemiology of fire blight. In: Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora.* J. Vanneste (ed.). Wallingford, UK, CABI, 2000. (<https://doi.org/10.1079/9780851992945.0009>)
- 2 Braun P.C. Epidemiology of fire blight of floricanne fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28 (1): 95-99. (<https://doi.org/10.1080/07060660609507275>)
- 3 Boucher M., Collins R., Harling K., Brind'Amour G., Hesler S., Wentworth K. et al. Field evaluation of interactions between insects and *Erwinia amylovora* in a New York apple orchard. *PhytoFrontiers*, 2021, 1: 94-103 (doi: 10.1094/PHYTOFR-10-20-0032-R)
- 4 Choi, H.J., Kim, Y.J. & Park, D.H. Extended longevity of *Erwinia amylovora* vectored by honeybees under in vitro conditions and its capacity for dissemination. *Plant Pathology*, 2021, 00, 1-10. (<https://doi.org/10.1111/ppa.13489>)
- 5 Boucher M., Collins R., Cox K., and Loeb G. Effects of exposure time and biological state on acquisition and accumulation of *Erwinia amylovora* by *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2019, 85: e00726-19 (<https://doi.org/10.1128/AEM.00726-19>)
- 6 Ordax M., Piquer-Salcedo J.E., Santander R.D., Sabater-Muñoz B., Biosca E.G., López M.M., et al. Medfly *Ceratitidis capitata* as Potential Vector for Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*: Survival and Transmission. *PLoS ONE*, 2015, 10 (5): e0127560. (doi:10.1371/journal.pone.0127560)
- 7 Boucher M., Collins R., Harling K., Brind'Amour G., Cox K., Loeb G. Interactions between *Delia platura* and *Erwinia amylovora* associated with Insect-Mediated transmission of shoot blight. *PhytoFrontiers*, 2021, 1: 62-74 (<https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-08-20-0013-R>)
- 8 EPPO. 2023. <https://gd.eppo.int/taxon/THOMOC>. *Resseliella oculiperda* (THOMOC). All Rights Reserved EPPO Cloud [www.zend91b]. Retrieval date 18.05.2023.
- 9 Vasil'ev V.P., Livshic I.Z. Vrediteli plodovyh kul'tur. M., 1984.
- 10 Janovs'kij Ju.P., Suhanov S.V., Grichanjuk V.P. Osoblivosti biologii ta shkidlivosti vichkovoï galici (*Thomasiniana oculiperda* Rubs.) i zahist vid nei sadzhanciv jabluni v rozsadniku Lisostepu Ukraïni. *Visnik Poltav's'koï derzhavnoï agrarnoi akademii*, 2015, 1-2: 32-35. (http://nbuv.gov.ua/UJRN/VPDAA_2015_1-2_8)
- 11 *Apples: botany, production, and uses.* Edited by D.C. Ferree and I.J. Warrington. CABI Publishing, Cambridge, 2003. (<https://doi.org/10.1017/S0014479704232057>)
- 12 Absatarova D.A., Kairova G.N., Korabaeva S.B., Drozda V.F. Species of phytophages and zoophages in yabluni nursery in South and South-East Kazakhstan. *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Agricultural Sciences*, 2020, 3 (57): 33-40. (https://nauka-nanrk.kz/assets/assets/журнал%202017%206/Аграрная_06_2017_ГОТОВ.pdf)
- 13 Izrail'skij V.P. (ed.). Bakterial'nye bolezni rastenij. M.: Sel'hozgiz, 1960.
- 14 Kolesova D.A. Zashhita plodovyh i jagodnyh kul'tur ot boleznej i vreditel'ej. M.: Sotium, 2010.
- 15 Stancheva J. Atlas boleznej sel'skohozjajstvennyh kul'tur. Tom 2. Bolezni plodovyh, jagodnyh,

orehoplodnyh kul'tur i vinograda. Sofija-Moskva, edition «Pensoft», 2005.

16 CABI Invasive Species Compendium: *Erwinia amylovora* (fireblight). Available at: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21908#todistribution> (Accessed May 2023)

17 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhamurzina 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. (https://www.researchgate.net/publication/260122985_Bacterial_Fire_Blight_in_the_Republic_of_Kazakhstan)

18 Santander R.D., Khodadadi F., Meredith C.L., Rađenović Ž., Clements J. and Ćimović S.G. Fire blight resistance, irrigation and conducive wet weather improve *Erwinia amylovora* winter survival in cankers. *Front. Microbiol.*, 2022, 13: 1009364. (doi: 10.3389/fmicb.2022.1009364)

19 Kairova G.N., Sapakhova Z.B., Daulet N., Absatarova D. The fire blight prevalence on different varieties of apple trees in the main industrial zone of horticulture (south and south-east of Kazakhstan). *BULLETIN of L.N. Gumilyov ENU. Bioscience Series*, 2023, 1 (142): 31-40 (doi: 10.32523/2616-7034-2023-142-1-31-40)

20 Sadanov A.K., Sulejmenova Zh.B., Ismailova Je.T., Shemshura O.N., Bajmahanova B.B., Bajmahanova G.B., Bis'ko N.A., Molzhigitova A.E., Elubaeva A.E., Tleubekova D.A. Bakterial'nyj ozhog plodovyh kul'tur. *Mikrobiologija zhӘne virusologija*, 2023. 1 (40): 35-46. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.02)

И.И. ТЕМРЕШЕВ^{1*}, Б.К. КОПЖАСАРОВ¹, З.Б. БЕКНАЗАРОВА¹, А.М. САРБАСОВА¹,
А.К. САДАНОВ², Э.Т. ИСМАЙЛОВА², А.Е. МОЛЖИГИТОВА², Р.В. ЯКОВЛЕВ³

¹Ж. Жиёмбаев ат. Қазақ өсімдік қорғау және карантин ҒЗИ, Алматы, Қазақстан

²Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

³Алтай мемлекеттік университеті, Барнаул, Ресей Федерациясы

*e-mail: temreshev76@mail.ru

RESSELIELLA OCULIPERDA (RÜBSAAMEN, 1893) (DIPTERA, CECIDOMYIIDAE) БҮРШІК ГАЛЛИЦАСЫ – ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ЖЕМІС DAҚЫЛДАРЫНЫҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙІК (*ERWINIA AMYLOVORA*) ҚOЗДЫРҒЫШЫНЫҢ JAҢA TACЫMАЛDAУШЫCЫ

Түйін

Көптеген жеміс дақылдарының зиянкестері *Resseliella oculiperda* Қазақстандағы *Erwinia amylovora* қоздырғышының жаңа тасымалдаушысы болып табылады. Бұл, әртүрлі уақытта, 2 шаруа қожалығындағы Апорт сортының алма ағаштарынан жиналған оның дернәсілдері мен пупарийлерін ПТР-талдау арқылы расталды. *R. oculiperda* көмегімен инфекцияның таралуы бірнеше жолмен жүруі мүмкін: 1) ауру жұқтырған ағаштардың бұтақтарында дамыған галлицалардың дернәсілдері, оның қуыршақтан шыққаннан кейін имаго құрттары қоздырғыш спораларын өзімен бірге басқа өсімдіктерге тасымалдай алады; 2) аналықтары ағаш бұтақтарына жұмыртқа салған кезде (аналықтары жұмыртқаларын дінге қабықтың, өскіндер мен бұтақтардың, бүршіктер мен көздердің жаңа механикалық зақымданған жерлеріне (жаралар, жарықтар және сызаттар) салады); 3) галлица дернәсілдерінің қоректену кезінде жолдар жасағанда, яғни инфекция желмен, жаңбырмен және дернәсілдердің өту жолдарына енетін басқа да жәндіктермен бірге пайда болған зақымдануларға енуі мүмкін; 4) бактериялардың ластанған топырақтан галлица дернәсілдерімен енуі. Қазақстанда бүршік галлицасының санымен күресу әдістері әлі де пысықталмаған және қазіргі уақытта республика аумағында кездесетін зиянкестердің нақты таралуы белгісіз. *R. oculiperda* жеміс дақылдарының бактериялық күйік сияқты қауіпті карантиндік аурудың тасымалдаушысы болғандықтан, алдағы уақытта бұл ақпаратты нақтылау қажет.

ПТР талдауы арқылы жүргізілген жұмыстардың нәтижелері бойынша микробиологиялық зерттеулерде бүршіктенген өт қабының *R. oculiperda* дернәсілдері мен пупарияларының барлық сынамаларында *Erwinia amylovora* ДНҚ табылғаны анықталды, жетіспейтін ақпаратты нақтылау үшін осы бағытта қосымша зерттеулер қажет.

Кілтті сөздер: *Resseliella oculiperda*, *Erwinia amylovora*, инфекцияны тасымалдаушы.

MPHTI: 68.03.07: 68.47.37

И.И. ТЕМРЕШЕВ^{1*}, Б.К. КОПЖАСАРОВ¹, З.Б. БЕКНАЗАРОВА¹, А.М. САРБАСОВА¹,
А.К. САДАНОВ², Э.Т. ИСМАЙЛОВА², А.Е. МОЛЖИГИТОВА², Р.В. ЯКОВЛЕВ³

¹Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений
им. Ж. Жиёмбаева, Алматы, Казахстан

²Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

³Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация

*e-mail: temreshev76@mail.ru

**ОКУЛИРОВОЧНАЯ ГАЛЛИЦА *RESSELIELLA OCULIPERDA* (RÜBSAAMEN, 1893)
(DIPTERA, CECIDOMYIIDAE) – НОВЫЙ ПЕРЕНОСЧИК ВОЗБУДИТЕЛЯ
БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА (*ERWINIA AMYLOVORA*) ПЛОДОВЫХ
В КАЗАХСТАНЕ**

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.10

Аннотация

Окулировочная галлица *Resseliella oculiperda*, вредитель многих плодовых культур, является новым переносчиком возбудителя бактериального ожога плодовых *Erwinia amylovora* в Казахстане. Это подтверждено с помощью ПЦР-анализа её личинок и пупариев, собранных на яблонях сорта Апорт в двух крестьянских хозяйствах в разное время. Распространение инфекции с помощью *R. oculiperda* может идти несколькими путями: 1) при развитии личинок галлицы в ветвях зараженных деревьев – имаго после выхода из пупария может уносить споры возбудителя на себе на другие растения; 2) при откладке яиц самками в ветви деревьев (самки откладывают яйца в свежие механические повреждения (ранки, трещины и царапины) коры на стволе, побегах и ветвях, почки и глазки); 3) при прокладке ходов личинками галлицы во время питания – в образовавшиеся повреждения инфекция может проникнуть с ветром, дождем, другими насекомыми, проникающими в ходы личинок; 4) занос бактерий личинками галлицы из зараженной почвы. В Казахстане методы контроля численности окулировочной галлицы не отработаны, и в настоящее время неизвестно фактическое распространение вредителя на территории республики. Поскольку *R. oculiperda* является переносчиком такого опасного карантинного заболевания, как бактериальный ожог плодовых, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении для уточнения отсутствующей информации.

Ключевые слова: *Resseliella oculiperda*, *Erwinia amylovora*, переносчик инфекции.

Видовой состав и значение насекомых при распространении бактериального ожога плодовых (*Erwinia amylovora* (Burrill, 1882) Winslow et al., 1920) в мировой практике изучается уже более 100 лет. Существует мнение, что наибольшую роль при этом играют опылители (перепончатокрылые, мухи и т.п.) и сосущие вредители (различные виды полужесткокрылых) [1-3]. По некоторым имеющимся данным, пчелы не питаются вытекающим бактериальным экссудатом, но могут переносить *E. amylovora* между цветами. По этому поводу имеются противоречивые данные. По одним сведениям, их роль в распространении бактериального ожога плодовых может быть завышена [3]. По другим данным, пчелы имеют довольно большое значение, как переносчики *E. amylovora*. Так, бактерии выживали в течение 15 дней на теле медоносных пчел и были наиболее обильны на брюшке по сравнению с другими частями тела, такими как губа, крылья и задние ноги [4]. В пищеварительной системе медоносных пчел *E. amylovora* сохранялась в течение 7 суток, а в экскрементах бактерии обнаруживались в течение 3 суток после контакта. Имеется предположение, что различные виды полужесткокрылых, после передвижения по бактериальному экссудату, впоследствии могут переносить бактерии во время питания, прокалывая стебли, листья и плоды кормовых растений, но это не выяснено до конца. Отдельная информация есть по двукрылым насекомым. Отмечено, что плодовые мухи

Drosophila melanogaster Meigen, 1830 охотно питаются бактериальным экссудатом; после этого насекомые сохраняли на себе жизнеспособные бактерии не менее 7 дней [5]. Экспериментально доказана возможность переноса бактериального ожога средиземноморской плодовой мухой *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) – опасным карантинным вредителем плодовых культур. *E. amylovora* может выживать в течение не менее 8 дней в пищеварительном тракте средиземноморской мухи и до 28 дней на поверхности тела [6]. Также доказана возможность переноса бактериального ожога плодовых другим опасным многоядным вредителем - ростковой мухой *Delia platura* (Meigen, 1826). Эти мухи могут переносить бактерии на теле в течение по крайней мере 5 дней [7]. Видовой состав и роль насекомых как агентов распространения *E. amylovora* в Казахстане не выяснены, что обуславливает актуальность настоящей работы. Одним из таких насекомых является глазковая, или окулировочная галлица.

Глазковая (окулировочная, или красная розанная) галлица (*Resseliella oculiperda* (Rübsaamen, 1893) = *Thomasiniana oculiperda* (Rübsaamen, 1893) = *Diplosis oculiperda* Rübsaamen, 1893) относится к семейству галлиц (Cecidomyiidae) отряда двукрылых насекомых (Diptera). Является вредителем многих плодовых культур. Повреждает грушу, яблоню, айву, алычу, абрикос, вишню, черешню, персик, сливу, черёмуху, боярышник, тёрн, кизил, инжир, шиповник, розы и др. Самки откладывают яйца в свежие механические повреждения (ранки, трещины и царапины) коры на стволе, побегах и ветвях, почки и глазки. Довольно часто яйцекладка происходит в места прививок при окулировке (отсюда русское название насекомого), и препятствует срастанию привоя и подвоя. Личинки данного вида в отличие от других представителей семейства галлов не образуют, питаются растительными тканями (камбием и др.) ствола, ветвей, побегов и почек растений-хозяев, а также раневыми выделениями подвоя. Они проделывают продольные ходы в древесине глазка, чем вызывают гибель и усыхание привоя. Гибель заокулированных глазков в результате жизнедеятельности галлицы на косточковых породах колеблется от 30% до 50 %, а на семечковых – от 15% до 30 %. Размножение партеногенетическое, самцы не обнаружены. Зимуют личинки в верхних слоях почвы. За вегетационный период развиваются 2-3 поколения, перекрывающихся друг с другом. Вредитель внесен в базу данных ЕОКЗР [8]. Распространение глазковой галлицы охватывает Западную Европу, среднюю и южную часть Восточной Европы [8-11]. В Казахстане является инвазивным видом, завезенным с посадочным растительным материалом, в настоящее время отмечена на юго-востоке страны [12]. Исходя из вышеизложенного, *R. oculiperda* предположительно может быть агентом переноса возбудителя бактериального ожога плодовых.

Бактериальный ожог плодовых – опасное карантинное заболевание плодовых культур, причиняющее значительный экономический ущерб во многих странах мира, в т.ч. и в Казахстане. Инфекция поражает более 160 видов растений семейства розоцветные, вызывая их быструю гибель [13-20]. Исходя из вышеизложенного, выбранное направление исследований является весьма актуальным. Целью работы являлось выяснить возможность переноса глазковой галлицей бактерии *E. amylovora*. В связи с этим были поставлены задачи провести сбор материала по данному вредителю и выявить с помощью лабораторного анализа наличие в нем возбудителя бактериального ожога плодовых.

Материалы и методы исследования

Материал собирался в яблоневых садах плодородческих хозяйств Алматинской области в 2023 году. Во время проведения мониторинговых обследований было отмечено развитие *R. oculiperda* на ветвях и стволах яблонь сорта Апорт, и было принято решение проверить данный вид на наличие возбудителя бактериального ожога плодовых. При проведении исследований применялись следующие методики:

1. Метод учета под корой. Сняв кору, на стволах деревьев собирают и подсчитывают количество обнаруженных личинок и имаго насекомых на палетку (50x20 см). Можно использовать специальный небольшой сачок, который прилегает полностью своим обрубом

к поверхности субстрата, что не позволяет насекомым выскользнуть в щель между сачком и субстратом. Метод применим для сбора жуков-ксилофагов, клопов, некоторых паразитических перепончатокрылых, отдельных виды пауков, многоножек, ложноскорпионов и др.

2. Метод отбора проб на бактериальный ожог плодовых. С соблюдением всех требований антисептики с каждого больного дерева отбирали по 3-4 пробы. При отборе проб вырезали пораженные части растений с захватом здоровой ткани. Один образец состоял из различных частей растений, собранных с одного дерева. Каждый образец включал соцветия, завязь, листья, плоды, молодые побеги, кору со скелетных ветвей и штамба. Отобранные образцы помещали в пакеты из фильтровальной бумаги вместе с этикеткой, где указывались регион, хозяйство, культура, сорт, возраст, площадь, дата отбора образца. Отобранные образцы в фильтровальных пакетах хранились в холодильнике до установления этиологии заболевания. Тот же метод применялся для сбора образцов личинок и пупариев окулировочной галлицы.

3. Идентификация *E. amylovora* молекулярно-генетическими методами. Выделение ДНК. Выделение ДНК из растительных образцов осуществлялось с помощью GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit #K0792 (ThermoFisher, США), а из бактерии - с помощью GeneJET Genomic DNA Purification Mini Kit #K0722 (ThermoFisher, США), очистка плазмид - с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit #K0503 (ThermoFisher, США) по инструкции, предложенной производителем данных реагентов. Для определения качества и количества выделенной ДНК проводили электрофорез на агарозном геле. Результаты электрофореза анализировались с помощью гель-документирующей системы с трансиллюминатором «Quantum-ST5, Vilber Lourmat».

Фотографии личинок и пупариев окулировочной галлицы были сделаны с помощью камеры Redmi 7.

Координаты пловодческих крестьянских хозяйств, где были проведены исследования:

- 1) КХ «Олжас», N 43°09'32.6" E 76°33'33.8";
- 2) КХ «Алатау», N 43°10'76.1" E 76°43'73.4".

Результаты и обсуждение

Всего было собрано 6 образцов личинок и пупариев окулировочной галлицы, 4 - в КХ «Алатау», и 2 - в КХ «Олжас» (рисунок 1).

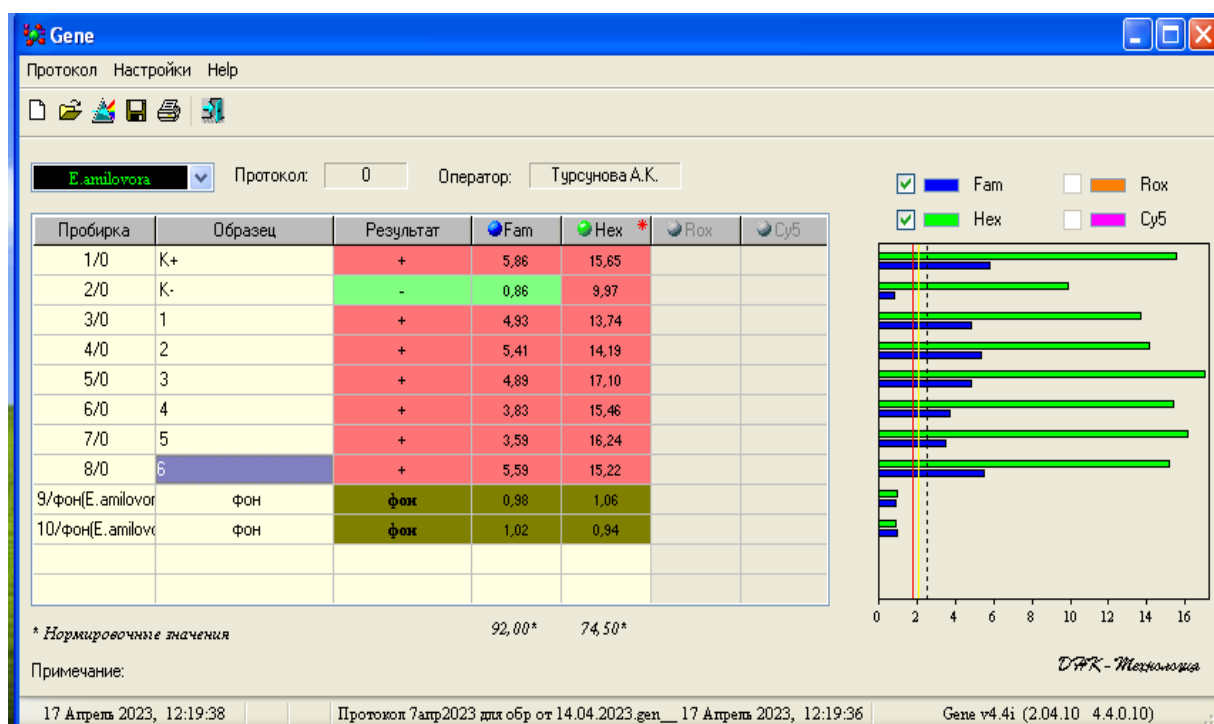


Рисунок 1 – Личинки (А) и пупарии (Б) окулировочной галлицы *Resselipella oculiperda*.

В результате проведенных исследований с помощью ПЦР-анализа собранных в разное время личинок и пупариев окулировочной галлицы *R. oculiperda* было установлено, что ДНК *E. amylovora* присутствует во всех образцах (рисунок 2).

Идентификация выделенных штаммов фитопатогена *Erwinia amylovora* проводилась методом FLASH-ПЦР.

Аmplификация проводилась на приборе - «Терцик» с помощью комплекта реагентов ПЦР амплификации ДНК *Erwinia amylovora* компании ООО «Агродиагностика», разработанных на основе базового состава реакционной системы и режима амплификации. Детекцию проводили на приборе «Джин» (ДНК Технология). Специализированный детектор флуоресценции «Джин» предназначен для регистрации результатов ПЦР при использовании комплектов реагентов, основанных на принципах флуоресцентной детекции (формат FLASH).



Примечание* Результат «+» - наличие в образце искомого возбудителя. Результат «-» - отсутствие патогена в образце. «K+» - положительный контроль, «K-» - отрицательный контроль.

Рисунок 2 – Протокол исследования образцов пупариев и личинок окулировочной галлицы для идентификации *E. amylovora* молекулярно-генетическим методом.

Таким образом, окулировочная галлица *R. oculiperda* является новым переносчиком возбудителя бактериального ожога плодовых.

Распространение *E. amylovora* окулировочной галлицей может идти несколькими путями:

1. При развитии личинок галлицы в ветвях зараженных деревьев – имаго после выхода из пупария может уносить споры возбудителя на себе на другие растения.
2. При откладке яиц самками галлицы в ветви деревьев (как указывалось выше, самки откладывают яйца в свежие механические повреждения (ранки, трещины и царапины) коры на стволе, побегах и ветвях, почки и глазки);
3. При прокладке ходов личинками галлицы во время питания – в образовавшиеся повреждения инфекция может проникнуть с ветром, дождем, другими насекомыми, проникающими в ходы личинок;
4. Занос бактерий личинками галлицы из зараженной почвы (как указывалось выше, личинки зимуют в верхних слоях почвы).

Возможно, существуют еще какие-то пути переноса галлицей возбудителя бактериального ожога плодовых, но пока они неизвестны.

Следует отметить, что в Казахстане методы контроля численности окулировочной галлицы не отработаны. В зарубежных источниках для борьбы с нею рекомендуется опрыскивание в период вегетации химическими инсектицидами Дитокс к.э., Циперус к.э. и Фуфанон к.э., Моспилан, р.п., Калипсо с.к., Сумитион к.э., Хловис с.к., Дурсбан с.к., Золон к.э., Ланнат р.к., Пиринекс к.э. и биопрепаратом Битоксибациллин п., а также протравливание семян перед посевом препаратами Имидалит ТПС и Искра М, к.э. В качестве агротехнического метода рекомендуется окуливание окулянтов сразу после прививки. Однако в условиях нашей страны эти препараты и методы не апробированы. Также в настоящее время неизвестно фактическое распространение вредителя на территории республики. Учитывая, что окулировочная галлица является переносчиком такого опасного карантинного заболевания, как бактериальный ожог плодовых, необходимо в будущем уточнить эту информацию.

Заключение

Окулировочная галлица, вредитель многих плодовых культур, является новым переносчиком возбудителя бактериального ожога плодовых в Казахстане. Это подтверждено с помощью ПЦР-анализа собранных в 2-х крестьянских хозяйствах в разное время её личинок и пупариев на яблонях сорта Апорт. Распространение инфекции *R. oculiperda* может идти несколькими путями: 1) при развитии личинок галлицы в ветвях зараженных деревьев – имаго после выхода из пупария может уносить споры возбудителя на себе на другие растения; 2) при откладке яиц самками в ветви деревьев (самки откладывают яйца в свежие механические повреждения (ранки, трещины и царапины) коры на стволе, побегах и ветвях, почки и глазки); 3) при прокладке ходов личинками галлицы во время питания – в образовавшиеся повреждения инфекция может проникнуть с ветром, дождем, другими насекомыми, проникающими в ходы личинок; 4) занос бактерий личинками галлицы из зараженной почвы (как указывалось выше, личинки зимуют в верхних слоях почвы). В Казахстане методы контроля численности окулировочной галлицы не отработаны, и в настоящее время неизвестно фактическое распространение вредителя на территории республики. Поскольку *R. oculiperda* является переносчиком такого опасного карантинного заболевания, как бактериальный ожог плодовых, необходимо в будущем уточнить эту информацию. В микробиологических исследованиях по результатам проведенных работ с помощью ПЦР-анализа было выявлено что во всех взятых пробах личинок и пупариев окулировочной галлицы *R. oculiperda* обнаружены ДНК *Erwinia amylovora*.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта, финансируемого Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан BR18574022 «Микробные препараты для борьбы с бактериальным ожогом плодовых культур».

Литература:

- 1 Thomson S.V. *Epidemiology of fire blight. In: Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora.* J. Vanneste (ed.). Wallingford, UK, CABI, 2000. (<https://doi.org/10.1079/9780851992945.0009>)
- 2 Braun P.C. Epidemiology of fire blight of floricanе fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28 (1): 95-99. (<https://doi.org/10.1080/07060660609507275>)
- 3 Boucher M., Collins R., Harling K., Brind'Amour G., Hesler S., Wentworth K. et al. Field evaluation of interactions between insects and *Erwinia amylovora* in a New York apple orchard. *PhytoFrontiers*, 2021, 1: 94-103 (doi: 10.1094/PHYTOFR-10-20-0032-R)
- 4 Choi, H.J., Kim, Y.J. & Park, D.H. Extended longevity of *Erwinia amylovora* vectored by

honeybees under in vitro conditions and its capacity for dissemination. *Plant Pathology*, 2021, 00, 1-10. (<https://doi.org/10.1111/ppa.13489>)

5 Boucher M., Collins R., Cox K., and Loeb G. Effects of exposure time and biological state on acquisition and accumulation of *Erwinia amylovora* by *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2019, 85: e00726-19. (<https://doi.org/10.1128/AEM.00726-19>)

6 Ordax M., Piquer-Salcedo J.E., Santander R.D., Sabater-Muñoz B., Biosca E.G., López M.M., et al. Medfly *Ceratitis capitata* as Potential Vector for Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*: Survival and Transmission. *PLoS ONE*, 2015, 10 (5): e0127560. (doi:10.1371/journal.pone.0127560)

7 Boucher M., Collins R., Harling K., Brind'Amour G., Cox K., Loeb G. Interactions between *Delia platura* and *Erwinia amylovora* associated with Insect-Mediated transmission of shoot blight. *PhytoFrontiers*, 2021, 1: 62-74 (<https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-08-20-0013-R>)

8 EPPO. 2023. <https://gd.eppo.int/taxon/THOMOC>. *Resseliella oculiperda* (THOMOC). All Rights Reserved EPPO Cloud [www.zend91b]. Retrieval date 18.05.2023.

9 Васильев В.П., Лившиц И.З. *Вредители плодовых культур*. М., 1984.

10 Яновський Ю.П., Суханов С.В., Гричанюк В.П. Особливості біології та шкідливості вічкової галиці (*Thomasiniana oculiperda* Rubs.) і захист від неї саджанців яблуні в розсаднику Лісостепу України. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*, 2015, 1-2: С. 32-35. (http://nbuv.gov.ua/UJRN/VPDAA_2015_1-2_8)

11 *Apples: botany, production, and uses*. Edited by D.C. Ferree and I.J. Warrington. CABI Publishing, Cambridge, 2003. (<https://doi.org/10.1017/S0014479704232057>)

12 Абсатарова Д.А., Каирова Г.Н., Корабаева С.Б., Дрозда В.Ф. Видовой состав фитофагов и зоофагов в питомнике яблони на юго-востоке Казахстана. *Известия национальной академии наук Республики Казахстан. Серия аграрных наук*, 2017, 6 (42): 120-125. (https://nauka-nanrk.kz/assets/assets/журнал%202017%206/Аграрная_06_2017_ГОТОВ.pdf)

13 Израильский В.П. (ред.). *Бактериальные болезни растений*. М.: Сельхозгиз, 1960.

14 Колесова Д.А. *Защита плодовых и ягодных культур от болезней и вредителей*. М.: Социум, 2010.

15 Станчева Й. *Атлас болезней сельскохозяйственных культур. Том 2. Болезни плодовых, ягодных, орехоплодных культур и винограда*. София-Москва, изд. «Пенсофт», 2005.

16 CABI Invasive Species Compendium: *Erwinia amylovora* (freblight). Available at: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/21908#todistribution> (Accessed May 2023)

17 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. (https://www.researchgate.net/publication/260122985_Bacterial_Fire_Blight_in_the_Republic_of_Kazakhstan)

18 Santander R.D., Khodadadi F., Meredith C.L., Rađenović Ž., Clements J. and Aćimović S.G. Fire blight resistance, irrigation and conducive wet weather improve *Erwinia amylovora* winter survival in cankers. *Front. Microbiol.*, 2022, 13: 1009364. (doi: 10.3389/fmicb.2022.1009364)

19 Kairova G.N., Sapakhova Z.B., Daulet N., Absatarova D. The fire blight prevalence on different varieties of apple trees in the main industrial zone of horticulture (south and south-east of Kazakhstan). *BULLETIN of L.N. Gumilyov ENU. Bioscience Series*, 2023, 1 (142): 31-40 (doi: 10.32523/2616-7034-2023-142-1-31-40)

20 Саданов А.К., Сулейменова Ж.Б., Исмаилова Э.Т., Шемшура О.Н., Баймаханова Б.Б., Баймаханова Г.Б., Бисько Н.А., Молжигитова А.Е., Елубаева А.Е., Тлеубекова Д.А. Бактериальный ожог плодовых культур. *Микробиология және вирусология*, 2023. 1 (40): 35-46. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.02)

IRSTI: 68.41.53

A.K. MUSSAYEVA¹, S.N. ABDRESHOV^{2*}, N.N. YEGOROVA¹,
A.N. YESHMUKHANBET^{2,3}, M.A. YESSENOVA^{2,3}, V.N. GORCHAKOV⁴,
G.A. DEMCHENKO²

¹Kazakh scientific-research veterinary institute, Almaty, Kazakhstan

²Institute of Genetics and Physiology, Almaty, Kazakhstan

³Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

⁴Research Institute of clinical and experimental Lymphology – branch of Institute of
Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

*e-mail: snabdreshov@mail.ru

CHARACTERISTICS OF BACTERIAL MICROFLORA IN RATS WITH MASSIVE INFECTION OF THE ABDOMINAL CAVITY

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.11

Abstract

Isolation of pathogens of infectious diseases isolated from animals, their identification based on the study of biological properties, determination of antibiotic resistance is an urgent task. During of inflammation of the abdominal cavity on a biological system *in vivo*, cultures of microorganisms were isolated on laboratory rats killed for diagnostic purposes, and their sensitivity to antibiotics was studied. As a result of the studies, it was found that on the 2nd and 5th days after infection of rats with coprological exudate an inflammatory process developed in the abdominal cavity, characterized by a disorder of blood and lymph circulation in blood and lymphatic vessels, in capillaries and venules, edema, hemorrhages in internal organs and vessels, necrosis tissues (on the 5th day after infection). As a result of bacteriological examination of exudate from the abdominal cavity, exudate from the abdominal cavity and liver of experimental rats, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms were isolated. Cultures were identified based on the study of cultural-morphological, tinctorial and biochemical properties. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* were isolated from samples of biological material of rats. The sensitivity of isolated microorganisms to antibiotics was studied. Knowledge of the etiology of infectious inflammation of the abdominal cavity of rats, the effect on pathogens of antibiotics of various groups, the correct selection of the drug contribute to the elimination of infection in the shortest possible time.

Keywords: exudate, abdominal inflammation, modeling, antibiotic resistance, lymph nodes.

Infectious diseases cause enormous economic damage to livestock production and represent the most important veterinary and biomedical problem [1]. The fight against infectious diseases of animals and humans is an urgent problem. Bacterial infections continue to occupy one of the leading places in the infectious pathology of animals and humans [2,3]. The main reservoir of infectious agents in nature are mammals, birds, and rodents [4]. Recently, the role of bacteria carriers as the main sources of infection of animals and humans has increased [5]. High incidence, increasing prevalence of bacterial infections, polymorphism of clinical forms (latent and erased forms) of the disease, frequent cases of the formation of long-term and lifelong bacterial carriage contribute to the infection of animals and humans. The widespread prevalence of antibiotic-resistant pathogens that cannot be treated indicates the urgency of the problem [6]. Solving the issues of asymptomatic bacterial carriage is closely related to the persistence of infectious agents in the body of laboratory rats during experimental peritonitis [7]. For the first time, the microbial landscape in rats infected intraperitoneally with a suspension of feces was studied. Modeling of scatological peritonitis in rats was carried out, and the body's immune response was studied. During a bacteriological study of biomaterial from rats with experimental peritonitis, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms were isolated. All experimental animals were clinically healthy. The sensitivity of isolated cultures of microorganisms to antibiotics of various

groups was studied. Irrational use of antibiotics, often using maximum doses, increasing the course of treatment and frequency of use of drugs without taking into account sustainability, as well as the pharmacokinetics of drugs, leads to the development of adverse reactions, the formation of drug sensitivity of pathogens and bacterial carriage.

The purpose: to study the bacterial microflora in rats with inflammation of the abdominal organs and against the background of antibiotic administration.

Materials and methods of research

Studies on creation of experimental peritonitis on biological system in vivo on laboratory rats were carried out. In accordance with the aim and objectives of the program 12 rats - Sprague Dawley (SD) line sexually mature males and weighing 270 ± 5 g were used in the experiments. The purpose of the work is experimental modeling of scatological inflammation of the abdominal stripe in rats, studying the body's immune response. For the experiment, 3 experimental and 1 control groups of animals were formed. There were 3 rats (male) in each group. 1st control group (3 heads) - uninfected animals that did not receive treatment; 2nd experimental group (3 heads) – rats infected with fecal suspension at a dose of 0.5 cm^3 intraperitoneally, killed 2 days after infection; 3rd experimental group (3 heads) - rats infected with fecal suspension at a dose of 0.5 cm^3 intraperitoneally were treated with the antibiotic ceftriaxone twice at a dose of 25 mg per 100 g of weight 12 hours after infection for the first time and a second time 24 hours after infection according to the instructions for use, killed 2 days after infection; 4th experimental group (3 heads) - rats infected with fecal suspension at a dose of 0.5 cm^3 intraperitoneally, killed 5 days after infection. The animals were kept in the vivarium on standard feeding and drinking regimen. Each experimental and control groups of animals were kept in a separate cage provided with individual drinker and feeding. During the experiment all rats received a complete balanced diet. Before the beginning of the experiment all rats of experimental and control groups were examined, weighed, and thermomtered.

Acute inflammation of the abdominal stripe in rats of the experimental groups was caused by intraperitoneal administration of a suspension of scatological material (feces) in a dose of 0.5 cm^3 10% suspension was prepared from fresh scatological material taken from rats in sterile boxing conditions in physiological solution. Animals of all experimental groups were injected intraperitoneally with 0.5 cm^3 of a 10% suspension of scatological material. The animals of the experimental and control groups were observed for 5 days. When slaughtering, samples of biological material were taken from rats in the experimental and control groups for bacteriological examination. Abdominal exudate, abdominal flush and a 20 g piece of liver were taken into sterile containers for microbiological analysis. Cultures from samples of biological material from rats onto nutrient media were carried out immediately after collection.

When performing the work, bacteriological, serological, and biochemical research methods were used. When setting up the experiment, the physiological characteristics of the animal's body were taken into account [8]. After slaughter, a pathological examination of the rat corpses was carried out [9]. Biomaterial sampling was carried out in accordance with the methodological recommendations for sampling [10].

The rat corpses were opened in sterile boxing conditions and collected pieces of liver, abdominal exudate, feces, etc. were placed in sterile Petri dishes. The liver at the puncture site was cauterized with a Pasteur pipette, tissue was collected into a Pasteur pipette and inoculated into test tubes with a nutrient medium. In sterile box conditions, a bacteriological study of biomaterial samples from slaughtered rats was carried out by seeding on liquid and solid nutrient media. The material was sown on solid and liquid nutrient media. Crops were done on MPB, MPA (Russia) and on special nutrient media (for cultivating intestinal bacteria on Endo medium, on Chromagard for cultivating coccal microflora, etc.). After 20 hours of cultivation at 37°C in a thermostat, the crops were examined visually, suspicious colonies were selected and smears were made. Bacteriological examination of biomaterial from rats was carried out in accordance with the "Guidelines for Bacteriological Diagnostics". Identification and taxonomic distribution of the

isolated crops were carried out in accordance with Bergey's identification guide [11]. The cultural and morphological properties of microorganisms were studied by inoculation on MPS, MPA (Russia) and differential diagnostic media. Microscopy was carried out on smears prepared from daily agar cultures, Gram-stained. The biochemical properties of microorganisms were studied by sowing isolated cultures on Hiss media with carbohydrates. The mobility of microbes was determined by growth on semi-solid agar [12].

To determine sensitivity to antibiotics, a daily broth culture of microorganisms that was not contaminated with foreign microflora was used. We used standard paper disks with antibiotics (2 mcg, 5×50 BioVitrum, Russia). The sensitivity of microorganism cultures isolated from animals was studied using the disk diffusion method in accordance with generally accepted methodological recommendations [13, 14]. 25 cm³ of MPA was sterilely poured into sterile Petri dishes with a diameter of 100 mm, culturing with test microorganisms (CFU 10⁶/mL). Before sowing, Petri dishes with agar were well dried in a thermostat for 48 hours. A bacterial suspension (a daily broth culture) in an amount of 0.1 cm³ was applied to the surface of the agar and evenly distributed with a spatula, after which discs soaked in various antibiotics were applied with sterile tweezers. In each cup, the effect of 7 antibiotics was tested. After application of the discs, the Petri dishes were incubated at a temperature of 37°C for 18-20 hours upside down. The results were assessed by the presence of zones of inhibited growth of microorganisms around the discs [15, 16, 17]. The absence of growth of the microorganism at a distance of more than 15 mm from the disk with the antibiotic indicated the sensitivity of the culture to this antibiotic. If the test microorganism developed in close proximity to the disk impregnated with the antibiotic, then this microorganism was assessed as resistant to the action of the antibiotic [18, 19]. The diameter of growth inhibition zones, taking into account the diameter of the disc itself, was measured with an accuracy of 1 mm. For quality control, test strains *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were used [20].

Results and discussion

The first clinical symptoms of the disease in animals of experimental groups 2 and 4 appeared on the second day after infection. The animals were lethargic, refused food, did not move, they were overcrowded, and there was slight swelling in the abdominal area. On clinical examination, rats in both groups exhibited anemia of visible mucous membranes. In animals of the 3rd experimental group, treated with the antibiotic ceftriaxone, 12 and 24 hours after infection, there were no clinical symptoms of the disease.

5 days after infection, the rats of the 4th experimental group were sacrificed. A pathological examination of rat carcasses was carried out. In rats of the 4th experimental group, pronounced pathological changes in the abdominal cavity were observed. Pathological changes were noted in the liver, spleen and intestines of rats in the form of hemorrhages and necrotic lesions. The internal organs were hyperemic, blood-filled and enlarged. Mesenteric lymphatics are enlarged, red, juicy. The abdominal cavity is enlarged and filled with milky, milky exudate with an unpleasant odor. The villi of the small intestine are enlarged, swollen, and filled with blood. Numerous erosions and necrotic lesions were observed on the mucous membrane of the small and large intestines. The liver is enlarged, yellow-red in color, filled with blood, with hemorrhages and dark foci of necrosis, clayey consistency. The gallbladder is enlarged and filled with bile. Exudate from the abdominal cavity was collected into sterile containers from killed rats, washing off a piece of liver from the abdominal cavity. As a result of the studies, it was established that on the 2nd and 5th days after infection of rats with coprological exudate in the abdominal cavity, acute inflammation of the abdominal cavity developed, in the form of peritonitis, which manifested itself as an inflammatory process characterized by a disorder of blood and lymph circulation in the blood and lymphatic vessels, in capillaries and venules, edema, hemorrhages in internal organs and vessels, tissue necrosis (5 days after infection). In experimental rats, there was a narrowing of the capillaries of the microcirculatory bed with emptying of the lumen of blood vessels, in which cellular elements of blood were found in small quantities. In the abdominal cavity there was a significant accumulation of serous and serous-purulent exudate, an inflammatory process and degenerative

changes were noted. The mucous membrane of the small intestine of rats showed severe swelling and pronounced inflammatory edema. The lymph nodes were enlarged. 5 days after infection, the rats showed dystrophic and degenerative changes in the abdominal organs. In experimental scatological peritonitis in animals of group 4, signs of diffuse fibrinous-purulent inflammation of the abdominal organs involving the deep layers of the peritoneum and underlying fatty and muscle tissues were found. The mucous membrane of the small intestine of rats showed severe swelling and pronounced inflammatory edema, enlargement of lymph nodes.

The results of the study showed that in the seeding from the flushing of the abdominal cavity, parenchymal organs, mesenteric lymph nodes from experimental rats 4, growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* was observed. In cultures from rats, growth of *P. aeruginosa* bacteria was observed. On MPA, *P. aeruginosa* grew in the form of convex small colonies with smooth blue-green edges. The MPB showed uniform turbidity. In Gram-stained smears, small gram-negative rods were observed, arranged in groups (clusters). In smears prepared from daily agar cultures and Gram stained, large gram-negative rods were noted, located singly in the smear, typical of *E.coli*. On MPA, *E.coli* grew as large, round, slimy, yellowish colonies

Thus, during the bacteriological study of biomaterial from rats of experimental groups 2 and 3 with experimental peritonitis and from rats of control group 1, no pathogenic microorganisms were sown.

From rats of the 4th experimental group, killed on the 5th day after infection, the causative agent of staphylococcal purulent infection *S.aureus* was isolated from all samples of biomaterial, presented in Figures 1,2.

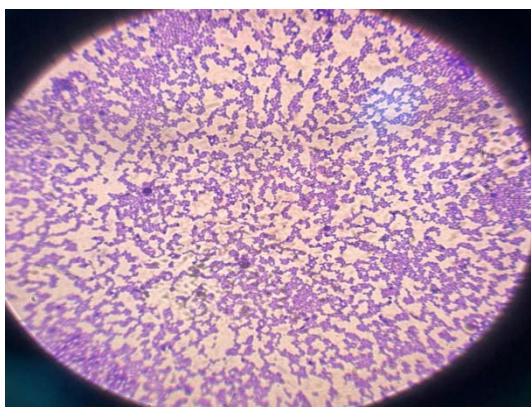


Figure 1 – *Staphylococcus aureus* in a Gram-stained smear (x1000)

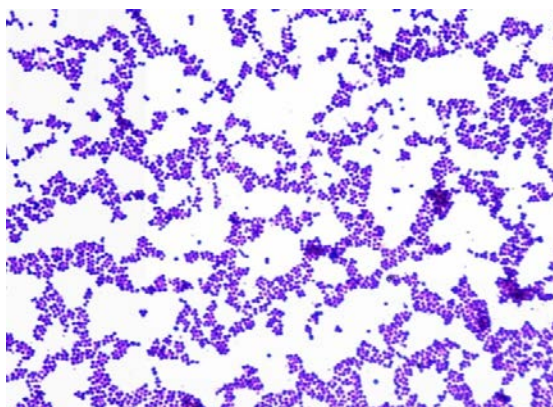


Figure 2 – *Staphylococcus aureus* in a Gram-stained smear (x1800)

Figures 1 and 2 show *Staphylococcus* isolated from biomaterial from rats of the 4th experimental group. The figures show gram-positive cocci of regular spherical shape, located in groups and clusters.

In seedings from all samples (exudate from the abdominal cavity, washings from the abdominal cavity, liver, spleen, heart, lung, kidney, large and small intestine) from 3 rats of the 4th experimental group, abundant growth of *P.aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) was observed. . Of all internal organ samples from rats of experimental group 4, growth of *P. aeruginosa* bacteria was noted. *P. aeruginosa* was cultured from parenchymal organs and mesenteric lymph nodes. Abundant growth of *P. aeruginosa* was observed in cultures from the mesenteric lymph nodes of rats, large and small intestines. *P. aeruginosa* was cultured from the liver and spleen of rats as moderate colony growth. *P. aeruginosa* was inoculated from the heart and kidney of rats in the form of single colonies. *P. aeruginosa* intensively disseminated not only in the intestine, but also in the parenchymal organs of infected rats. On the MPB, *P. aeruginosa* grew as a uniform turbidity, forming a film and turning the medium blue-green. *P. aeruginosa* isolated from rats is shown in Figure 3.

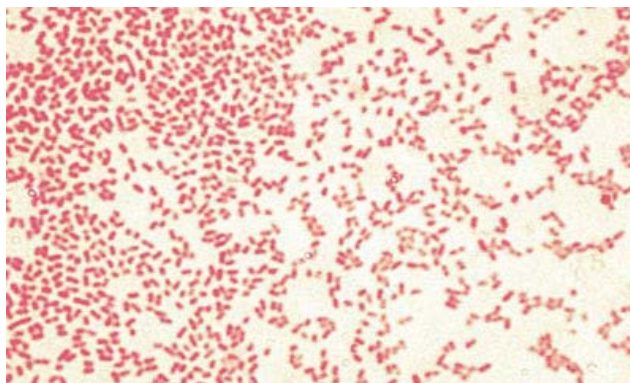


Figure 3 – *P. aeruginosa* in a Gram-stained smear (x1800)

Figure 3 shows straight, small gram-negative rods with rounded ends. No contamination with foreign microflora was noted. The figure shows that *Pseudomonas aeruginosa* has a straight or slightly curved rod-shaped shape. *P. aeruginosa* is an opportunistic microorganism. However, as a result of the widespread use of antibiotics for treatment and as a growth stimulator in animals, *P. aeruginosa* is the causative agent of various inflammatory processes, including generalized forms.

In seedings from all samples of biomaterial from 3 rats of the 4th experimental group, abundant growth of *E. coli* was observed. *E. coli* was abundantly cultured from all biomaterial samples. On the MPB, *Escherichia coli* grew in the form of intense turbidity with the formation of sediment and gas; on the MPB, round, shiny, convex colonies grew in an S-shape. *E. coli* was plated on Endo differential diagnostic medium for enterobacteria. Round, large, shiny colonies of bright crimson color grew on Endo medium.

Highest sensitivity *E. coli* isolated from rat feces was observed with fluoroquinolone antibiotics (norfloxacin, ofloxacin up to 34 mm), gentamicin (30 mm), tetracycline (25 mm), ceftriaxone (23 mm).

As a result of an experiment conducted on white laboratory rats, experimental peritonitis caused by the causative agent of purulent-septic infections *S.aureus* was caused. Purulent peritonitis in rats was complicated by conditionally pathogenic microorganisms - *Pseudomonas aeruginosa* *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* *E.coli*, isolated from biomaterial from rats as a result of bacteriological research

During a postmortem examination of rats, pathoanatomical and degenerative changes in the abdominal cavity were observed, characterized by the accumulation of serous-purulent exudate, dystrophic tissue degeneration, massive hemorrhages and foci of necrosis. As a result of a bacteriological study, the causative agent of purulent-septic infections *S. aureus*, *P.aeruginosa* and *E. coli* was isolated from all samples of biological material from rats of the 4th experimental group. In rats of the 3rd experimental group, twice treated with the antibiotic ceftriaxone in accordance with the instructions for use, no pathogenic microorganisms were found, which indicates the high therapeutic effectiveness of the antibiotic. Ceftriaxone is a third generation cephalosporin. *Cephalosporins* are a class of β -lactam antibiotics whose chemical structure is based on 7-*aminocephalosporanic acid* (7-ASA). The main features of cephalosporins compared to penicillins are their greater resistance to β -lactamase enzymes produced by microorganisms.

Fluoroquinolones are divided into first-generation and second-generation antibiotics. Of the fluoroquinolones, ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin are included in the list of vital and essential drugs. As a result of the experiment, it was established that the greatest sensitivity in experimental peritonitis in rats was observed with fluoroquinolone antibiotics, cephalosporins, aminoglycosides and tetracycline.

Conclusion

Based on the study of biological properties, the identification of isolated microorganisms was carried out. The cultures were identified on the basis of culture-morphological, tinctorial and biochemical properties. On the 5th day after infection in experimental rats purulent-necrotic peritonitis caused by *S. aureus*, complicated by conditionally pathogenic microorganisms *P. aeruginosa* and *E. coli* was observed. *E. coli* showed high sensitivity to tetracyclines. Antibiotics of tetracyclines group, which are widely used in clinic and veterinary medicine for the treatment of infections. *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* isolated from rat biomaterial showed sensitivity to aminoglycosides (gentamicin) and showed high sensitivity to fluoroquinolones, which are currently considered one of the most important groups of antibacterial drugs and were characterized by activity mainly against Gram-negative bacteria. Fluoroquinolones have activity against a wide range of pathogens causing infections of the abdominal cavity inflammation. High efficacy and good tolerability of fluoroquinolones in acute inflammatory processes was shown in comparative analyses of studies of antibacterial drugs of different groups.

References:

- 1 Adeyemi O. A., José A. RA, et al. Editorial: Alternative and complementary methods for the control of infectious diseases in animals. *Front. Vet. Sci., Sec. Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 2022, 9: 1-3 (doi.org/10.3389/fvets.2022.1015253)
- 2 Delphine DG. Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018, 5: 14 (doi: 10.3389/fvets.2018.00014)
- 3 Ayukekbong J.A., Ntemgwana M., Atabe A.N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob. Resist. Infect. Cont.* 2017, 6:47 (doi: 10.1186/s13756-017-0208-x)
- 4 Barrett A. Vector and Rodent-borne Diseases in Europe and North America: Distribution, Public Health Burden and Control. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, 13(8): 1278 (doi:10.3201/eid1308.070626)
- 5 Eisen RJ., Ensore RE., Atiku LA., Zielinski-Gutierrez E., Mpanga JT., Kajik E, et al. Evidence that rodent control strategies ought to be improved to enhance food security and reduce the risk of rodent-borne illnesses within subsistence farming villages in the plague-endemic West Nile region, Uganda. *Int J Pest Manag.* 2013, 59(4): 259–270 (doi:10.1080/09670874.2013.845321)
- 6 Zhao Y., Yang QE., Zhou X., Wang FH., Muurinen J, Virta MP., et al. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: status and solutions. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2021, 51: 2159–96 (doi:10.1080/10643389.2020.1777815)
- 7 Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, et al. The Peritoneum: Beyond the Tissue—A Review. *Front Physiol*. 2018, 9: 738 (doi:10.3389/fphys.2018.00738)
- 8 Monica L. Andersen, Lucile M.F. Winter Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *Biomedical Sciences An. Acad. Bras. Ciênc.* 2019, 91(1) (doi.org/10.1590/0001-3765201720170238)
- 9 Freires IA, Morelo DFC, Soares LFF, Costa IS, de Araújo LP, Breseghello I, Abdalla HB, Lazarini JG, Rosalen PL, Pigossi SC, Franchin M. Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. *rch Toxicol*. 2023, 97(9): 2329-2342 (doi:10.1007/s00204-023-03532-1)
- 10 Prudnikov V.S., Zhukov A.I., German S.P., Anisim I.A. *Patologicheskaja anatomija sel'skohozjajstvennyh zhivotnyh. Uchebnoe posobie / «Uchebnik.- Minsk: Informacionno-vychislitel'nyj centr Minfina*. 2010:1-351 (<https://elibrary.ru/item.asp?id=27391943>)
- 11 Hoult Dzh., Krig N., Snit P. *Opredelitel' bakterij Berdzhi / Mir. Moskva*. 1997. (https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_61284#1)
- 12 Don J. Brenner, Noel R. Krieg, George M. Garrity, David R. Boone (Vice Chairman), Paul Vos, Michael Goodfellow, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. / Springer, New York (NY)*. 2005. [Электрон.ресурс]. - URL: (<https://voifidoctor2.files.wordpress.com/2013/03/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology-volume-ii-part-b.pdf>)
- 13 Bajmahanova G.B., Fajzulina Je.R., Tatarkina L.G., Spankulova G.A., Mombekova G.A., Bajmahanova B.B., Balgimbaeva A.S., Tleubekova D.A., Akylova M.A., Serikova A.H., Daurenbekova Sh.Zh., Doolotkel'dieva T.D., Trenozhnikova L.P. *Izuchenie antibakterial'nyh svojstv aktinomycetov iz*

jekstremal'nyh mestoobitanij Kazahstana. *Mikrobiologija i virusologija*. 2023, 3(42):193-210. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12)

14 Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016, 387: 176–187 (doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

15 Umiralieva Zh.Z., Dzhajmurzina A.A. Chuvstvitel'nost' vozbuditel'ja bakterial'nogo ozhoga bakterij *Erwinia amylovora* k antibiotikam. *Mikrobiologija i virusologija*. 2023, 2(41):220-228. (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.15)

16 Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*. 2019, 9:49. (doi: 10.3390/diagnostics9020049)

17 Syal K., Mo M., Yu H., Iriya R., Jing W., Guodong S., Wang S., Grys T.E., Haydel S.E., Tao N. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*. 2017, 7:1795–1805. (doi:10.7150/thno.19217)

18 Gould IM., Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence*. 2013;4(2):185–191. (doi: 10.4161/viru.22507)

19 Lee A.S., Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018, 4: 18033 (doi: 10.1038/nrdp.2018.33)

20 Aslanzadeh, J. Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Springer, Boston*. 2006: 84-116. (doi:10.1007/0-387-32892-06)

А.К. МУСАЕВА¹, С.Н. ӘБДІРЕШОВ^{2*}, Н.Н. ЕГОРОВА¹, А.Н. ЕШМУХАНБЕТ^{2,3},
М.А. ЕСЕНОВА^{2,3}, В.Н. ГОРЧАКОВ⁴, Г.А. ДЕМЧЕНКО²

¹Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринариялық институты, Алматы Қазақстан

²Генетика және физиология институты, Алматы Қазақстан

³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы Қазақстан

⁴Клиникалық және эксперименттік лимфология ғылыми-зерттеу институты – РҒА СБ
Цитология және генетика институтының филиалы, Новосибирск, Ресей Федерациясы

*e-mail: snabdreshov@mail.ru

ҚҰРСАҚ ҚУЫСЫНДА ИНФЕКЦИЯСЫ БАР ЕГЕУҚҰЙРЫҚТАРДЫҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ МИКРОФЛОРАСЫНА СИПАТТАМА

Түйін

Жануарлардан бөлініп алынған жұқпалы аурулардың қоздырғыштарын оқшаулау, олардың биологиялық қасиеттерін зерттеу негізінде, антибиотикке төзімділіктілігін анықтау өзекті міндетердің бірі болып табылады. *In vivo* биологиялық жүйесіндегі іш қуысының қабынуы кезінде диагностикалық мақсатта өлтірілген зертханалық егеуқұйрықтарда микроорганизмдердің дақылдары оқшауланып, олардың антибиотиктерге сезімталдығы зерттелді. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде егеуқұйрықтарды іш қуысына копрологиялық экссудатпен жұқтырғаннан кейін 2-ші және 5-ші күні эксперименттік перитонит дамығаны анықталды, ол қан мен лимфа тамырларындағы, капиллярлар мен венулалардағы қан мен лимфа айналымының бұзылуымен, ұлпалардың ісінумен, ішкі мүшелер мен тамырлардағы геморрагиялармен, некрозбен сипатталатын қабыну процесінде көрінді (инфекциядан кейін 5 күн). Құрсақ қуысының экссудатын, құрсақ қуысының экссудатын және тәжірибелі егеуқұйрықтардың бауырын бактериологиялық зерттеу нәтижесінде патогендік және шартты патогендік микроорганизмдер бөлініп алынды. Дақылдарды культуралды-морфологиялық, тинкториалдық және биохимиялық қасиеттерін зерттеу негізінде анықталды. Егеуқұйрықтардың биологиялық материалының сынамаларынан *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* оқшауланған. Оқшауланған микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығы зерттелді. Егеуқұйрықтардың жұқпалы іш қабынуының этиологиясын білу, әр түрлі топтағы антибиотиктердің қоздырғыштарына әсер ету, препаратты дұрыс таңдау инфекцияны қысқа мерзімде жоюға ықпал етеді.

Кілт сөздер: экссудат, құрсақ қуысының қабынуы, модельдеу, антибиотиктерге төзімділік, лимфа түйіндері.

MPHTI: 68.41.53

А.К. МУСАЕВА¹, С.Н. АБДРЕШОВ^{2*}, Н.Н. ЕГОРОВА¹, А.Н. ЕШМУХАНБЕТ^{2,3},
М.А. ЕСЕНОВА^{2,3}, В.Н. ГОРЧАКОВ⁴, Г.А. ДЕМЧЕНКО²

¹Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан

²Институт генетики и физиологии, Алматы, Казахстан

³Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, Казахстан

⁴НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики, Новосибирск, Российская федерация

*e-mail: snabdreshov@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ У КРЫС ПРИ МАССИРОВАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.11

Аннотация

Выделение возбудителей инфекционных заболеваний от животных, их идентификация на основе изучения биологических свойств, определение антибиотикорезистентности является актуальной задачей. В результате проведенных исследований установлено, что на 2-е и 5-е сутки после инфицирования крыс копрологическим экссудатом в брюшную полость развивался воспалительный процесс, характеризующийся расстройством крово- и лимфообращения в кровеносных и лимфатических сосудах, в капиллярах и венулах, отеком, гемorragиями во внутренних органах и сосудах, некрозом тканей (на 5 сутки после заражения). В результате бактериологического исследования экссудата из брюшной полости и печени опытных крыс были выделены патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Культуры идентифицировали на основе изучения культурально-морфологических, тинкториальных и биохимических свойств. Из проб биологического материала крыс выделены *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Изучена чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам. Знание этиологии инфекционного воспаления брюшной полости крыс, действие на возбудителей антибиотиков различных групп, правильный подбор препарата способствуют ликвидации инфекции в кратчайшие сроки.

Ключевые слова: экссудат, воспаление брюшной полости, моделирование, антибиотикорезистентность, лимфатические узлы.

Инфекционные болезни наносят огромный экономический ущерб животноводству и представляют важнейшую ветеринарную и медико-биологическую проблему [1]. Борьба с инфекционными болезнями животных и человека является актуальной проблемой. Бактериальные инфекции продолжают занимать одно из ведущих мест в инфекционной патологии животных и человека [2,3]. Основным резервуаром возбудителей инфекций в природе являются млекопитающие, птицы, грызуны [4]. В последнее время возросла роль бактерионосителей как основных источников заражения животных и человека [5]. Высокая заболеваемость, возрастающая распространенность бактериальных инфекций, полиморфизм клинических форм (латентные и стертые формы) болезни, частые случаи формирования длительного и пожизненного бактерионосительства способствуют заражению животных и человека. Широкое распространение антибиотикорезистентных возбудителей, не поддающихся лечению, свидетельствует об актуальности проблемы [6]. Решение вопросов бессимптомного бактерионосительства тесно связано с персистенцией возбудителей инфекций в организме лабораторных крыс при экспериментальном перитоните [7]. Впервые изучен микробный пейзаж у крыс, зараженных внутрибрюшинно взвесью фекалий. Проведено моделирование копрологического перитонита у крыс, изучен иммунный ответ организма. При бактериологическом исследовании биоматериала от крыс с экспериментальным перитонитом выделены патогенные и условно патогенные

микроорганизмы. Изучена чувствительность выделенных культур микроорганизмов к антибиотикам различных групп. Нерациональное применение антибиотиков зачастую с использованием максимальных доз, увеличение курса лечения и кратности применения препаратов без учета чувствительности, а также особенностей фармакокинетики лекарственных препаратов приводит к развитию побочных реакций, формированию лекарственной устойчивости возбудителей и бактерионосительства.

Цель исследования: изучить бактериальной микрофлоры у крыс при воспалении органов брюшной полости и на фоне введение антибиотика.

Материал и методы исследования

Проведены исследования по созданию экспериментального перитонита на биологической системе *in vivo* на лабораторных крысах. В соответствии с целью и задачами программы в экспериментах использовали 12 крыс- линии Sprague Dawley (SD) половозрелых самцах и весом 270 ± 5 г. Для эксперимента были сформированы 3 опытных и 1 контрольная группы животных. В каждой группе было по 3 крысы (самцы). 1-я контрольная группа (3 головы)- не инфицированные животные, не получавшие лечения; 2-я опытная группа (3 головы) – крысы, зараженные фекальной суспензией в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутрибрюшинно, убитые через 2-е суток после инфицирования; 3-я опытная группа (3 головы) - крысы, зараженные фекальной суспензией в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутрибрюшинно, получали лечение антибиотиком цефтриаксоном дважды в дозе 25 мг на 100 г веса через 12 часов после заражения первый раз и второй раз - через 24 часа после заражения согласно наставлению по применению, убитые через 2 суток после инфицирования; 4-я опытная группа (3 головы) - крысы, зараженные фекальной суспензией в дозе $0,5 \text{ см}^3$ внутрибрюшинно, убитые через 5 суток после инфицирования. Животные содержались в виварии на стандартном режиме кормления и поения. Каждая опытная и контрольная группы животных находились в отдельной клетке, обеспеченной индивидуальной поилкой и кормлением. В течение эксперимента все крысы получали полноценное сбалансированное питание. Перед началом эксперимента всех крыс опытных и контрольной групп осматривали, взвешивали, термометрировали.

Острое воспаление брюшной полости у крыс опытных групп вызывали путем внутрибрюшинного введения суспензии копрологического материала (фекалий) в дозе $0,5 \text{ см}^3$.10% суспензию готовили из свежего копрологического материала, отобранного от крыс, в стерильных условиях бокса на физиологическом растворе. Животным всех опытных групп вводили нутрибрюшинно $0,5 \text{ см}^3$ 10% суспензии копрологического материала. За животными опытных и контрольной групп вели наблюдение в течение 5 суток. У крыс опытных и контрольной групп при забое отбирали пробы биологического материала для бактериологического исследования. В стерильные контейнеры отбирали экссудат из брюшной полости, смыв из брюшной полости и кусочки печени весом 20 г для микробиологического анализа. Через 20 часов проводили визуальную оценку посевов из проб биоматериала от крыс.

При выполнении работы использовались бактериологические, серологические, биохимические методы исследований. При постановке опыта учитывали физиологические особенности организма животных [8]. После забоя проводили патологоанатомический осмотр трупов крыс [9]. Отбор проб биоматериала проводили в соответствии с методическими рекомендациями по отбору проб [10].

Крыс вскрывали в стерильных условиях бокса, отбирали в стерильные чашки Петри кусочки печени, брюшного экссудата, фекалий и др. Печень на месте прокола прижигали пастеровской пипеткой, набирали в пастеровскую пипетку ткань и засевали в пробирки с питательной средой. В стерильных условиях бокса проводили бактериологическое исследование проб биоматериала от забитых крыс путем высева на жидкие и плотные питательные среды. Посевы делали на МПБ, МПА (Россия) и на специальные питательные среды (для культивирования бактерий кишечной группы - на среду Эндо, на хромагар - для

культивирования кокковой микрофлоры и др.). Через 20 часов культивирования при +37°C в термостате посеvy просматривали визульно, отбирали нетипичные колонии и делали мазки. Бактериологическое исследование биоматериала от крыс проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике». Идентификацию и таксономическое распределение выделенных культур осуществляли в соответствии с определителем Берджи [11]. Культурально-морфологические свойства микроорганизмов изучали путем посева на МПБ, МПА, дифференциально-диагностические среды. Проводили микроскопию мазков, приготовленных из суточных агаровых культур, окрашенных по Граму. Биохимические свойства микроорганизмов изучали при посеve выделенных культур на среды Гисса с углеводами. Подвижность микробов определяли по росту на полужидком агаре [12]. Для определения чувствительности к антибиотикам использовали суточную бульонную культуру микроорганизмов, не контаминированную посторонней микрофлорой. В работе использовали стандартные бумажные диски с антибиотиками (2 мкг, 5×50 БиоВитрум, Россия). Чувствительность культур микроорганизмов, выделенных от животных, изучали диско-диффузным методом в соответствии с общепринятыми методическими рекомендациями [13, 14]. В стерильные чашки Петри диаметром 100 мм стерильно наливали по 25 см³ МПА, культивирование тест-микроорганизмов (КОЕ 10⁶/мл).

Перед посевом чашки Петри с агаром хорошо подсушивали в термостате в течение 48 часов. Бактериальную суспензию (суточную бульонную культуру) в количестве 0,1 см³ наносили на поверхность агара и равномерно распределяли шпателем, после чего стерильным пинцетом накладывали диски, пропитанные различными антибиотиками. В каждой чашке испытывали действие 7 антибиотиков. После аппликации дисков чашки Петри инкубировали при температуре 37°C в течение 18-20 часов кверху дном. Оценку результатов проводили по наличию зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков [15,17]. Отсутствие роста тест-организма на расстоянии более 15 мм от диска с антибиотиком указывало на чувствительность культуры к данному антибиотику. Если испытуемый микроорганизм развивался в непосредственной близости от диска, пропитанного антибиотиком, то данный микроорганизм оценивали, как устойчивый к его действию. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм [18,19]. Диаметр зон задержки роста с учетом диаметра самого диска измеряли с точностью до 1 мм. Для контроля качества использовали тест-штаммы *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [20].

Результаты и обсуждение

Первые клинические симптомы заболевания у животных 2-й и 4-й опытных групп появились на вторые сутки после инфицирования. Животные были вялыми, отказывались от корма, не двигались, наблюдалась их скуденность, отмечался небольшой отек в области живота. При клиническом осмотре у крыс обеих групп наблюдалась анемия видимых слизистых оболочек. У животных 3-й опытной группы, леченных антибиотиком цефтриаксоном, через 12 и 24 часа после заражения, клинические симптомы заболевания отсутствовали.

Через 5 суток после заражения крысы 4-й опытной группы были забиты. Проводили патологоанатомический осмотр тушек крыс. У крыс 4-й опытной группы наблюдались выраженные патологоанатомические изменения в брюшной полости. Отмечались патологические изменения в печени, селезенке и кишечнике крыс в виде кровозлияний, некротических очажков. Внутренние органы были гиперемированы, кровенаполнены и увеличены. Брыжеечные лимфатические узлы увеличены и гиперемированы. Брюшная полость увеличена, заполнена мутным экссудатом молочного цвета с неприятным запахом. Ворсинки тонкого кишечника набухшие, кровенаполнены. Желчный пузырь расширен, заполнен желчью. В стерильные контейнеры от убитых крыс отбирали экссудат из брюшной полости, смыв из брюшной полости и кусочек печени. В результате проведенных

исследований установлено, что на 2-е и 5-е сутки после инфицирования крыс копрологическим экссудатом в брюшную полость развивалось острое воспаление брюшной полости в виде перитонита, который проявлялся расстройством крово- и лимфообращения в кровеносных и лимфатических сосудах, в капиллярах и венах, отеком, геморрагиями во внутренних органах и сосудах, некрозом тканей (на 5 сутки после заражения). У опытных крыс отмечалось сужение капилляров микроциркулирующего русла с запустеванием просвета сосудов, в которых в небольшом количестве обнаруживались клеточные элементы крови. В брюшной полости наблюдалось значительное скопление серозного и серозно-гнойного экссудата, отмечался воспалительный процесс и дистрофические изменения. На слизистой оболочке тонкого отдела кишечника крыс отмечалось сильное набухание и выраженный воспалительный отек, увеличение лимфатических узлов.

Результаты исследования показали, что в посевах из смыва брюшной полости, паренхиматозных органов, брыжеечных лимфатических узлов от крыс 4-й опытной группы отмечался рост синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* и кишечной палочки *Escherichia coli*. На МПА *P. aeruginosa* росли в виде выпуклых мелких колоний с ровными краями сине-зеленого цвета. На МПБ наблюдалось равномерное помутнение. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдались мелкие грамотрицательные палочки, расположенные группами (скоплениями). В мазках, приготовленных из суточных агаровых культур и окрашенных по Граму, отмечались крупные грамотрицательные палочки, располагающиеся в мазке одиночно, типичные для *E.coli*. На МПА *E.coli* росли в виде крупных круглых слизистых колоний желтоватого цвета.

Таким образом, при бактериологическом исследовании биоматериала от крыс 2-й и 3-й опытных групп с экспериментальным перитонитом и от крыс 1-й контрольной группы патогенные микроорганизмы не высевались. От крыс 4-й опытной группы, забитых на 5-е сутки после инфицирования, из всех проб биоматериала выделен возбудитель стафилококковой гнойной инфекции *S. aureus*, представленный на рисунках 1,2.

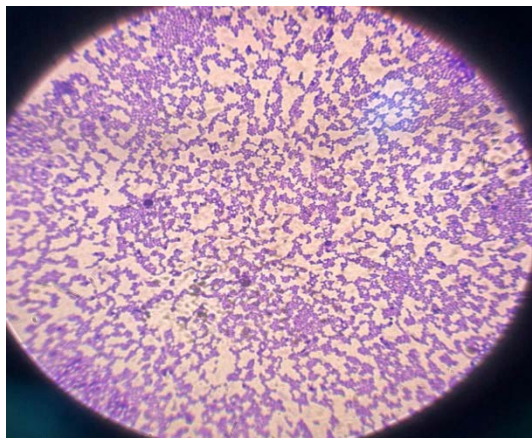


Рисунок 1 – *Staphylococcus aureus* в мазке, окрашенном по Граму (увл.1000х)

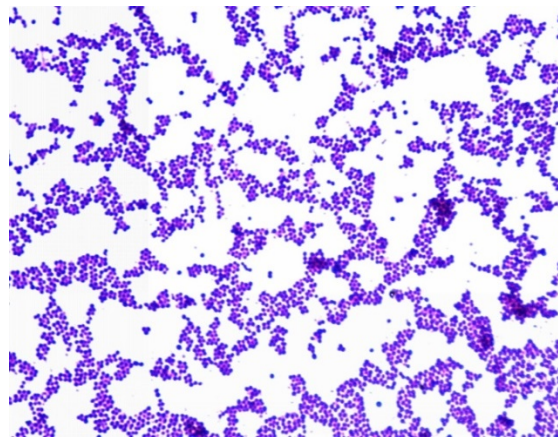


Рисунок 2 – *Staphylococcus aureus* в мазке, окрашенном по Граму (увл. 1800х)

На рисунках 1 и 2 показаны стафилококки, выделенные из биоматериала от крыс 4-й опытной группы. На рисунках видны грамположительные кокки правильной шарообразной формы, располагающиеся группами и скоплениями. Стафилококки обладают выраженной гемолитической и протеолитической способностью, что является их таксономическим признаком. Гемолитические свойства стафилококков, выделенных от крыс 4-й опытной группы, изучали путем посева суточной бульонной культуры на кровяной агар.

В посевах из всех проб (экссудат из брюшной полости, смыв из брюшной полости, печень, селезенка, сердце, легкое, почка, толстый и тонкий отделы кишечника) от 3-х крыс 4-й опытной группы наблюдался обильный рост *P.aeruginosa* (синегнойная палочка).

Обильный рост *P. aeruginosa* отмечался в высевах из брыжеечных лимфатических узлов крыс, толстого и тонкого отделов кишечника. *P.aeruginosa* высевалась из печени и селезенки крыс в виде умеренного роста колоний. Из сердца, почки крыс *P.aeruginosa* высевалась в виде единичных колоний. *P.aeruginosa* интенсивно диссеминировала не только в кишечнике, но и в паренхиматозных органах зараженных крыс. На МПБ *P. aeruginosa* росла в виде равномерного помутнения с образованием пленки и окрашиванием среды в сине-зеленый цвет. На МПА выростали мелкие круглые колонии, окрашенные в сине-зеленый цвет (характерное для синегнойной палочки пигментообразование). *P. aeruginosa*, выделенная от крыс, представлена на рисунке 3.

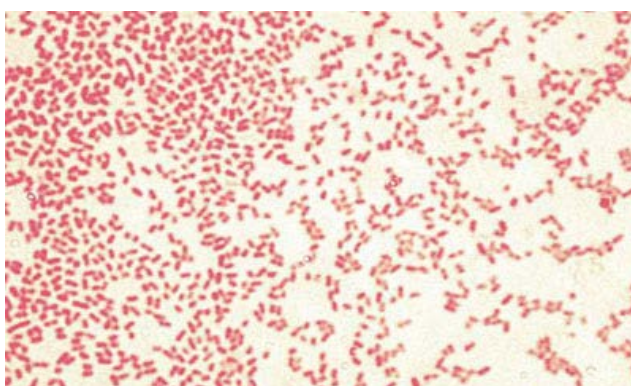


Рисунок 3 - *P. aeruginosa* в мазке, окрашенном по Граму (увл. 1800х)

На рисунке 3 видны прямые мелкие грамтрицательные палочки с закруглёнными концами. Контаминации посторонней микрофлорой не отмечалось. На рисунке показано, что синегнойная палочка имеет прямую или слегка изогнутую палочковидную форму. *P. aeruginosa* условно-патогенный микроорганизм. Однако в результате широкого применения антибиотиков для лечения и в качестве стимулятора роста у животных *P. aeruginosa* является возбудителем разнообразных воспалительных процессов, в том числе генерализованных форм.

Изучена чувствительность *P. aeruginosa* к антибиотикам различных групп. *P. aeruginosa* проявила высокую чувствительность к цефалоспорином - цефтриаксону (32 мм), к цефотаксиму (29 мм), к антибиотикам фторхинолонового ряда - офлоксацину, норфлоксацину (до 30 мм), к аминогликозидам - гентамицину (31 мм).

В высевах из всех проб биоматериала от 3-х крыс 4-й опытной группы наблюдался обильный рост *Escherichia coli*. На МПБ *E.coli* росла в виде интенсивного помутнения с образованием осадка и газа, на МПА выростали круглые блестящие выпуклые колонии в S-форме. *E.coli* высевали на дифференциально-диагностическую среду Эндо для энтеробактерий. На среде Эндо росли круглые крупные блестящие колонии яркомалинового цвета. Культуры, выделенные от крыс, не контаминированы посторонней микрофлорой. Наибольшая чувствительность *E. coli*, выделенной из фекалий крысы, отмечалась к антибиотикам фторхинолонового ряда (норфлоксацин, офлоксацину до 34 мм), гентамицину (30 мм), тетрациклину (25 мм), цефтриаксону (23 мм).

Таким образом, в результате опыта, проведенного на белых лабораторных крысах, вызван экспериментальный воспалительный процесс в виде перитонита, обусловленный возбудителем гнойно-септических инфекций *S.aureus*. Гнойный перитонит крыс осложнялся условно патогенными микроорганизмами – синегнойной палочкой *P. aeruginosa* и кишечной палочкой *E.coli*, выделенными из биоматериала от крыс в результате бактериологического исследования.

При патологоанатомическом осмотре у крыс наблюдались патологоанатомические и дегенеративные изменения в брюшной полости, характеризовавшиеся скоплением серозно-гнойного экссудата, дистрофическим перерождением ткани, массовыми геморрагиями и

очажками некроза. В результате бактериологического исследования из всех проб биологического материала от крыс 4-й опытной группы выделены возбудитель гнойно-септических инфекций *S.aureus*, а также *P.aeruginosa* и *E.coli*. У крыс 3-й опытной группы, которые получившие лечение антибиотиком цефтриаксоном в соответствии с наставлением по применению, патогенных микроорганизмов не обнаружено, что свидетельствует о высокой терапевтической эффективности антибиотика. Цефтриаксон относится к цефалоспорином III поколения. Цефалоспорины (*cephalosporins*) - класс β -лактаманых антибиотиков, в основе химической структуры которых лежит 7-аминоцефалоспороновая кислота (7-АЦК). Основными особенностями цефалоспоринов по сравнению с пенициллинами является их большая резистентность по отношению к β -лактамазам-ферментам, вырабатываемым микроорганизмами.

Фторхинолоны подразделяют на препараты первого поколения и второго поколения антибиотиков. Из препаратов группы фторхинолонов офлоксацин, ципрофлоксацин и моксифлоксацин входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. В результате проведенного эксперимента установлено, что наибольшая чувствительность при экспериментальном перитоните крыс отмечалась у антибиотиков фторхинолонового ряда, цефалоспоринов, аминоглизидов и тетрациклина.

Заключение

Культуры идентифицировали на основе изучения культурально-морфологических и биохимических свойств. На 5-е сутки после инфицирования у опытных крыс наблюдается гнойно-некротический перитонит, вызванный *S. aureus*, осложненный условно патогенными микроорганизмами *P. aeruginosa* и *E.coli*. *E. coli* проявила высокую чувствительность к тетрациклинам. Антибиотики группы тетрациклинов, широко применяются в клинике и ветеринарии для лечения инфекций.

S. aureus, *P. aeruginosa* и *E.coli*, выделенные из биоматериала от крыс, проявили чувствительность к аминогликозидам (гентамицину) и показали высокую чувствительность к фторхинолонам (англ. *fluoroquinolones*), которые на сегодняшний день рассматриваются как одна из важнейших групп антибактериальных препаратов и характеризуются активностью преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий. Фторхинолоны обладают активностью в отношении широкого спектра патогенов, вызывающих инфекции брюшной полости. Высокая эффективность и хорошая переносимость фторхинолонов при острых воспалительных процессах была показана в сравнительных анализах исследований антибактериальных препаратов разных групп.

Литература:

- 1 Adeyemi O. A., José A. RA, et al. Editorial: Alternative and complementary methods for the control of infectious diseases in animals. *Front. Vet. Sci., Sec. Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 2022, 9: 1-3 (doi.org/10.3389/fvets.2022.1015253)
- 2 Delphine DG, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, et al. The one health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front Vet Sci*. 2018, 5: 14 (doi: 10.3389/fvets.2018.00014)
- 3 Ayukekbong J.A., Ntemgwa M., Atabe A.N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies. *Antimicrob. Resist. Infect. Cont.* 2017, 6:47 (doi: 10.1186/s13756-017-0208-x)
- 4 Barrett A. Vector and Rodent-borne Diseases in Europe and North America: Distribution, Public Health Burden and Control. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, 13(8): 1278 (doi:10.3201/eid1308.070626)
- 5 Eisen RJ., Ensore RE., Atiku LA., Zielinski-Gutierrez E., Mpanga JT., Kajik E, et al. Evidence that rodent control strategies ought to be improved to enhance food security and reduce the risk of rodent-borne illnesses within subsistence farming villages in the plague-endemic West Nile region, Uganda. *Int J Pest Manag.* 2013, 59(4): 259–270 (doi:10.1080/09670874.2013.845321)

6 Zhao Y., Yang Q.E., Zhou X., Wang F.H., Muurinen J., Virta M.P., et al. Antibiotic resistance in the livestock and aquaculture industries: status and solutions. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2021, 51: 2159–96 (doi:10.1080/10643389.2020.1777815)

7 Isaza-Restrepo A, Martin-Saavedra JS, Velez-Leal JL, et al. The Peritoneum: Beyond the Tissue—A Review. *Front Physiol.* 2018, 9: 738 (doi:10.3389/fphys.2018.00738)

8 Monica L. Andersen, Lucile M.F. Winter Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *Biomedical Sciences An. Acad. Bras. Ciênc.* 2019, 91(1) (doi.org/10.1590/0001-3765201720170238)

9 Freires IA, Morelo DFC, Soares LFF, Costa IS, de Araújo LP, Breseghello I, Abdalla HB, Lazarini JG, Rosalen PL, Pigossi SC, Franchin M. Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. *Toxicol.* 2023, 97(9): 2329-2342 (doi:10.1007/s00204-023-03532-1)

10 Прудников В.С., Жуков А.И., Герман С.П., Анисим И.А. *Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных. Учебное пособие.* «Учебник.- Минск: Информационно-вычислительный центр Минфина. 2010:1-351 (<https://elibrary.ru/item.asp?id=27391943>)

11 Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи / Мир. Москва. 1997. (https://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_61284#1)

12 Don J. Brenner, Noel R. Krieg, George M. Garrity, David R. Boone (Vice Chairman), Paul Vos, Michael Goodfellow, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed.* / Springer, New York (NY). 2005. [Электрон. ресурс]. - URL: (<https://voifidoctor2.files.wordpress.com/2013/03/bergeys-manual-of-systematic-bacteriology-volume-ii-part-b.pdf>)

13 Баймаханова Г.Б., Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А., Момбекова Г.А., Баймаханова Б.Б., Балгимбаева А.С., Глеубекова Д.А., Акылова М.А., Серикова А.Х., Дауренбекова Ш.Ж., Доолоткельдиева Т.Д., Треножникова Л.П. Изучение антибактериальных свойств актиномицетов из экстремальных местообитаний Казахстана. *Микробиология и вирусология.* 2023, 3(42):193-210. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.03.12)

14 Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 2016, 387: 176–187 (doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0)

15 Умираниева Ж.З., Джаймурзина А.А. Чувствительность возбудителя бактериального ожога бактерий *Erwinia amylovora* к антибиотикам. *Микробиология и вирусология.* 2023, 2(41):220-228. (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.15)

16 Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics.* 2019, 9:49. (doi: 10.3390/diagnostics9020049)

17 Syal K., Mo M., Yu H., Iriya R., Jing W., Guodong S., Wang S., Grys T.E., Haydel S.E., Tao N. Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics.* 2017, 7:1795–1805. (doi:10.7150/thno.19217)

18 Gould IM., Bal AM. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. *Virulence.* 2013;4(2):185–191. (doi: 10.4161/viru.22507)

19 Lee A.S., Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018, 4: 18033 (doi: 10.1038/nrdp.2018.33)

20 Aslanzadeh, J. Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Springer, Boston.* 2006: 84-116. (doi:10.1007/0-387-32892-06)

IRSTI: 62.41.09, 62.41.31

A.A. MYRZAKHMET^{1,2*}, T.D. MUKASHEVA², T.I. DAVLYATSHIN¹,
B.M. KHAIRULLIN¹, A.M. NAMEY¹, G.Zh. SARSENBAYEVA¹, D.A. INKARBEKOV¹,
S.M. BARMAK^{1,2}, T.T. DAVLYATSHIN³, A.A. SIZOV⁴, G.S. AUBAKIROVA⁵,
M.B. ORYNBAYEV¹

¹MVA Group Research and Development Center, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

³Kazakhstan-Russian Medical University, Almaty, Kazakhstan

⁴Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

⁵National Reference Center for Veterinary Medicine, Astana, Kazakhstan

*e-mail: A_00_00@mail.ru

DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF REAGENTS FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS TYPE A BY ELISA METHOD

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.12

Abstract

This article presents the development of an innovative technology for the production of reagent kits for the detection of antibodies to FMD virus type A using enzyme-linked immunosorbent assay. FMD virus type A is of significant medical and veterinary importance, and effective diagnostic methods play an important role in controlling and counteracting its spread.

The process of technology development involves selecting optimal marker antibodies, optimizing antigen-antibody interaction conditions, and identifying a suitable reagent carrier. As a result, an effective technique has been developed that provides high sensitivity and specificity for the detection of antibodies to FMD virus type A.

The article describes in detail the stages of development, including chemical and biochemical methods of reagent modification, study of their stability and activity. The results of validation of the technology on a panel of clinical samples are also presented, which confirms high accuracy and reliability of the developed methodology.

The results obtained lead to the conclusion that the developed technology is promising for application in medical and veterinary laboratories, as well as in scientific research in the field of virology. The new technique can significantly improve the diagnosis and control of FMD type A virus, contributing to effective measures to prevent and control its spread.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay, FMD, antibody, antigen, reagent.

Foot-and-mouth disease is a highly contagious viral disease affecting domestic and wild ungulates [1]. The disease belongs to the category of transboundary diseases that can cause epizootics and cause great economic damage to livestock.

The pathogenic RNA contains a virus of the *Ricornaviridae* family, belonging to the family of *Aphthoviruses*. FMDV has seven immunologically distinct serotypes (O, A, C, Asian 1, SAT 1, SAT 2 and SAT 3) [2]. FMDV serotypes were initially identified in animal immunity experiments. An animal that has recovered from infection with one serotype has been shown to be resistant to infection with that serotype while still being susceptible to infection with any other serotype. Different serotypes of FMDV are common in certain geographical regions. Thus, serotypes A, O and Asia-1 are common in Asia, serotypes A, O and C are found in Europe and South America, and serotypes A, O and SAT predominate in Africa. All serotypes are clinically indistinguishable from each other, but they differ in geographic distribution, genetic and antigenic properties. These stable genetic groups were called topotypes (geographical types). There are many genetic lineages of FMDV in each topotype [3].

The virus genome encodes four structural and eight non-structural proteins. Both groups of proteins induce antibody production in animals during infection. After FMD, specific antibodies (IgG and/or IgM, IgA) to structural proteins and non-structural proteins appear. Antibody titers rise rapidly over time and remain high. Thus, the presence of FMD-specific antibodies in a sample indicates that the sampled animal has been exposed to or vaccinated against FMD virus. Antibodies to both structural and non-structural proteins are produced in FMD-infected animals, with antibodies to structural proteins being predominantly detected in vaccinated animals. This is due to the partial purification of the virus during vaccine production, during which most of the nonstructural proteins are removed together with cellular debris [4].

The initial diagnosis of FMD usually involves the identification of typical clinical signs in affected animals. The clinical signs of FMD are similar in all species, but their expression may vary considerably. Clinical signs of FMD are not a reliable indicator of FMD infection, as in some cases FMD in ruminants may be asymptomatic. Such vector animals are a source of new outbreaks. Thus, there is a need to develop a rapid serological method to detect asymptomatic FMD animals in areas where FMD vaccination is not practiced. In addition, there is a need for a test to determine the effectiveness of vaccination in areas where prophylactic immunization of animals against FMD is carried out.

ELISA is characterized by high sensitivity, ease of installation, accuracy of measurement results and rapid response. In addition, ELISA correlates with other immunochemical methods in the detection of FMD antigens and surpasses them in sensitivity by several times.

Currently, several commercial test systems for the detection of antibodies to FMD virus structural proteins are available on the global veterinary diagnostics market: «PrioCHECK™ FMDV Type A Antibody ELISA Kit, strip», «ID Screen® FMD Type A Competition», «VDPPro® FMDV Type A ELISA». All existing analogs are based on the competitive ELISA method.

For the Republic of Kazakhstan there is a constant risk of introduction of this disease from neighboring countries, as evidenced by the outbreak of FMD in Kazakhstan in 2011-2013, caused by the importation of infection from China and Kyrgyzstan [5]. After a long period of well-being, in 2021 FMD was detected in farms in Karaganda region [6]. At the same time, the development and improvement of FMD diagnostic tools and methods is directly related to the problem of ensuring biological security of the country. Despite the urgency of the problem, at present there are no domestic kits for the detection of antibodies to FMD virus in blood sera of vaccinated and diseased animals in the Republic of Kazakhstan.

In Kazakhstan, test systems have not been developed to detect antibodies to FMD virus. Therefore, the creation of domestic production of vaccines and diagnostic tools against especially dangerous and socially significant diseases to meet the needs of the Republic of Kazakhstan is an important task for the development of the country. Development of test-systems for detection of antibodies to FMD virus is one of the main guarantees of struggle against this economically important disease. The realization of the project will make it possible to develop an effective tool for FMD diagnostics, which will contribute to epizootic well-being in the country.

Materials and methods of research

The reagent kits for detection of antibodies to FMD virus type A by ELISA method were used:

- 96-well plate (8 wells x 12 rows).

Each row consists of 8 wells and the plate consists of 12 rows. Each well is pre-coated with recombinant VP1 antigen of FMD virus type A. The wells are made of transparent plastic. On the left edge of the plate the letters A-H are vertically marked in alphabetical order. The bottom edge of the plate is horizontally marked with Arabic numerals 1 - 12. On the right edge of the plate is a bar code with the serial number and product name.

- Negative control sera: in solution (colorless or light yellow liquid) or lyophilized (dry porous tablet), free of particles.

- Positive control sera: as a solution (colorless or light yellow liquid) or lyophilized (as a dry porous tablet), without particles.

- Wash solution (25X concentrated): clear, slightly opalescent, colorless liquid in a translucent plastic vial with label, particle-free.

- Conjugate solution: clear green colored liquid in a brown labeled glass vial, free of particles.

- Dilution Buffer Solution-Sera (DBS-S): clear blue colored liquid in a clear plastic vial with label, no particles.

- TMB-Substrate: clear colorless liquid in a clear plastic brown labeled vial, no particles.

- Stop reagent: clear colorless liquid in a clear plastic vial with label, particle-free.

- Adhesive membrane: transparent rectangular polyester membrane.

- Laboratory equipment according to safety requirements.

- Ultrapure water: at least equivalent to class 3 for water according to ISO 3696:1987 (E).

- Single channel pipette (20 - 200 μ L).

- Multichannel pipette (5 - 50 μ L).

- Multi-channel pipette (50 - 300 μ L).

- Pipette tips (according to pipette manufacturer's recommendations).

- Solution containers.

- Funnel.

- Special tubes for blood collection.

- Multiscan EX plate analysis devices.

The device is equipped with an appropriate filter set to read plates at 450 nm.

- Tecan EIA plate washing device.

- To obtain recombinant protein we used *Escherichia coli* strain ER2566/pET/VP1-A obtained by transformation of expression plasmid pET-26b(+) carrying VP1 gene of FMD virus type A structural protein antigen.

- FMD A_pET-26b (+) plasmids were obtained from GenScript Biotech Pte LTD (Singapore) (www.genscript.com).

- Rabbits weighing 2.5-3.0 kg were used for sera production.

994 animal sera samples were analyzed.

- Cattle: 564 samples

- Sheep and goats: 246 samples

- Pigs: 184 samples

For comparative research:

- VDPPro ® FMDV Type A ELISA - Kits for the detection of antibodies to FMD virus serotypes A, manufactured by MEDIAN Diagnostics, Inc. (Republic of Korea). A type - series 1FMDA22001, valid until 01.03.2021.

- PrioCHECK™ FMDV Type A Antibody ELISA Kit - ELISA for the in vitro determination of antibodies against FMDV in the sera of cattle, pigs, sheep and goats. Development organization: Prionics AG (Switzerland). A type - Series FA 201101L, valid until 31.05.2021.

- Experimental series Set of reagents for detection of antibodies to FMD virus type A by ELISA method, produced by «MVA Group Research and Production Center» LLP (Republic of Kazakhstan). A type - series 05, valid until 12.03.2023.

Results and discussion

Preparation of recombinant VP1 antigen of FMD virus type A:

Escherichia coli strain ER2566/pET/VP1-A obtained by transformation of expression plasmid pET-26b(+) carrying VP1 gene of FMD virus type A structural protein antigen was used to obtain recombinant protein.

Competent *E. coli* cells were cultured in LB medium (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, distilled water to 1000 mL, 50 μ g/mL kanamycin, pH 7.5) at 37°C, for 18-24 hours until OD₆₀₀=0.6~0.8. Then isopropyl- β ,D-thiogalactopyranoside at a concentration of 0.2 mM was

added to induce gene expression. After the addition of the inducer, the cells were cultured at 30°C for 6 hours.

For each recombinant protein, purification conditions were selected to maximize the protein yield with a purity degree of at least 95%. *E. coli* cells containing the designed chimeric recombinant protein were precipitated by centrifugation at 3000g for 20 min, the precipitate was washed with 1/3 volume of saline, centrifuged at 3000g for 20 min, and resuspended in 10-30 ml of metal affinity chromatography buffer (25mM sodium phosphate buffer pH 7.4, 400mM NaCl, 20 mM imidazole). Cells were disrupted by ultrasound (22kHz, 4 times for 20 seconds each), and the insoluble fraction was separated by centrifugation at 50000g for 45 minutes. The insoluble fraction (precipitate) was resuspended in 10 ml of 25mM metal affinity chromatography buffer with 8M urea, incubated for 1 hour on a magnetic stirrer, then centrifuged at 50000g for 45 minutes. The thus obtained clarified lysate was filtered through a nylon filter (pore diameter 0.45 µm) and subjected to metal-affinity chromatography. The recombinant protein was purified on a HisTrap column (Amersham, USA). Elution was performed with buffer (25mM sodium phosphate buffer pH 7.4, 400mM NaCl, 200mM imidazole, 8M urea). Renaturation of recombinant protein was performed by dialysis against 300-fold volume of 25mM sodium phosphate buffer pH 7.25 with 300mM NaCl. The renatured protein was analyzed by denaturing electrophoresis in 15% polyacrylamide gel (PAAG) [7].

The molecular mass of recombinant VP1 antigen of FMD virus type A synthesized by the strain was 34 kDa.

The concentration of purified recombinant antigen was determined by the Bradford method [8]. The maximum concentration of recombinant VP1 antigen of FMD virus type A was 500 µg/mL.

Cryopreservation of the production strain was performed using LB, 20% glycerol, 10% sucrose, 10% polyvinylpyrrolidone, cell concentration of 109 CFU/mL.

For lyophilization of the production strain, skim milk protective medium was used at a 1:1 ratio, cell concentration 109 CFU/ml.

The lyophilized dried strain is stored at a temperature not higher than +8°C, and cryopreserved samples are stored at a storage temperature of -80°C.

Production of negative control sera:

Negative control sera were obtained from clinically healthy (unvaccinated and disease-free) cattle that did not contain antibodies to FMD virus. Individual blood samples were first incubated at 36-38°C for 30-60 minutes and then at 2-8°C for 24 hours to separate the blood clot. The settled individual sera samples were tested for the presence of antibodies in ELISA. A series was then prepared by mixing the individual samples. The thoroughly mixed sera mixture was filtered through a 0.2 µm size filter.

As part of the kit, the sera may be presented in liquid or lyophilized form.

Preservation and packaging of native sera:

Proclin (0.05%) was added as a preservative. The resulting preparation was packaged in 1.0 cm³ vials.

Preparation of lyophilized sera:

Sera were packed into vials and stored before lyophilization at (5±1)°C for not more than 3 days. Lyophilization of sera was carried out in a vacuum drying apparatus at a residual pressure in the working chamber of about 50 microns and condensate temperature of minus (50±5)°C. The heating temperature is maintained at 30 to 35°C. At the end of the sublimation period, the heating is increased to 45°C. At a constant temperature in the material (14-20)°C, the drying process lasts about 8 hours. The duration of the whole drying process ranges from 20-28 h. The vials were corked under vacuum (450-500 microns). The moisture content of the preparation should not exceed 4%.

The sera were stored at 2-8°C.

Production of positive control sera:

Rabbits weighing 2.5-3.0 kg were used for sera production. For hyperimmunization, a preparation containing recombinant FMD virus type A antigen and adjuvant was used. The adjuvant used was saponin, its analogs or oil adjuvants such as Freund's incomplete adjuvant. The resulting preparation was injected 1-2 cm³ into the interfinger tissues of the hind limbs of rabbits (0.1-0.2 cm³ at each injection point). After 28 days, rabbits were inoculated again, intramuscularly, in the thigh region with a double dose of the original preparation of recombinant antigen in the volume of 2-5 cm³ with the addition of 2.5 mg of saponin as adjuvant. After 10 days, the animals were exsanguinated and blood sera was obtained.

Individual blood samples were first incubated at 36-38°C for 30-60 minutes and then at 2-8°C for 24 hours to separate the blood clot. The settled individual sera samples were tested for type specificity and activity in ELISA. A series was then prepared by mixing type-specific individual samples of equal activity. The thoroughly mixed sera mixture was filtered through a 0.2 µm size filter.

As part of the kit, the sera could be presented in liquid or lyophilized form.

Preservation and packaging of native sera:

Proclin (0.05%) was added as a preservative. The resulting preparation was packaged in 1.0 cm³ vials.

Preparation of lyophilized sera:

Sera were packed into vials and stored before lyophilization at (5±1)°C for not more than 3 days. Lyophilization of sera was carried out in a vacuum drying apparatus at a residual pressure in the working chamber of about 50 microns and condensate temperature of minus (50±5)°C. The heating temperature was maintained at 30 to 35°C. At the end of the sublimation period, the heating was increased to 45°C. At a constant temperature in the material of (14-20)°C, freeze-drying lasts about 8 h. The duration of the whole drying process ranges from 20-28 h. The vials were corked under vacuum (450-500 microns). The moisture content of the preparation should not exceed 4%.

The sera were stored at 2-8°C.

Enzyme conjugate production:

- A solution of mouse monoclonal antibody to animal IgG conjugated to horseradish peroxidase was prepared.

- Mixed bovine sera albumin with proclin (0.05%) as a preservative.

- Poured into vials and stored at 2-8°C.

Production of enzyme conjugate diluent:

- Sodium phosphate buffer and procline (0.05%) were prepared.

- Poured into vials and stored at 2-8°C.

Production of washing solution (25X concentrated):

- Prepared sodium phosphate buffer-Tween 20 (10x concentrated) and Proclin (0.05%).

- Poured into vials and stored at 2-8°C.

Production of TMB substrate:

- Prepared a solution of tetramethylbenzidine substrate mixed with hydrogen peroxide.

- Poured into vials and stored at 2-8°C.

Production of stopping solution:

- 1N-sulfuric acid was prepared

- Poured into vials and stored at 2~8°C.

Procedure for performing an enzyme-linked immunosorbent assay:

During the study it was necessary to choose the ELISA variant suitable for antibody detection. As a result of experimental work, it was found that the indirect ELISA variant is the most effective. The essence of the method is that recombinant FMD virus antigen adsorbed in a solid phase interacts with specific antibodies. The resulting immune complex is detected by horseradish peroxidase conjugated with G-protein and chromogenic substrate. The essence of the method is shown in Figure 1-2.

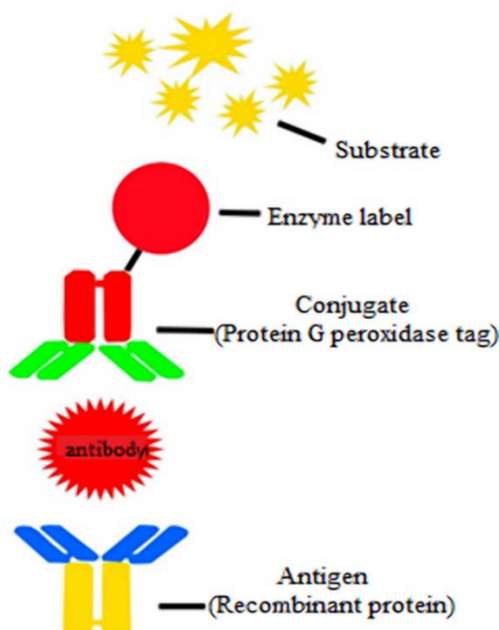


Figure 1 – Scheme of indirect variant of solid-phase ELISA

Conditions for setting up an ELISA:

- 1) Add 100 µl of positive control to wells A1 and B1 of the plate and 100 µl of negative control to wells C1 and D1.
- 2) Add 80 µl of sera dilution buffer solution (DBS-S) to the remaining wells of the plate.
- 3) Add the test samples (sera or plasma) 20 µl/well into the wells of the plate containing the sera dilution buffer solution (DBS-S) and mix by pipetting. The final dilution ratio is 1:5. Be careful not to spill samples from well to well.
- 4) Cover the plate with a lid or adhesive tape, and incubate for 30 min at 37°C.
- 5) Wash each well of the plate 5 times with 1X wash buffer (at least 250 µl per well), removing the well contents at each washing step. After the final wash, invert the plate onto a paper towel to remove residual solution from the wells.
- 6) Add 100 µl of conjugate solution to each well of the plate.
- 7) Cover the plate and incubate for 30 min at 37°C.
- 8) Wash each well of the plate as described in step 5.
- 9) Add 100 µl of TMB substrate to each well of the plate.
- 10) Incubate for 15 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark.
- 11) Add 100 µl of stop reagent to each well of the plate.
- 12) Measure the absorbance of the wells using a bichromatic spectrophotometer at a wavelength of 450 nm. Interpretation of the results should be completed within 10 minutes of the end of the assay. Wait until the bubbles have completely disappeared before reading the results.

The ELISA scheme is shown in Figure 2.

Figure 2 – shows the layout of the control and test samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	C+	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	C-	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	C-	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
Notes: «C+» – positive control; «C-» – negative control; «1-92» – test samples												

Recording and interpretation of results:

Before taking measurements, set the «0» of the photometer by air.

The reaction results are considered reliable and can be counted if the controls meet the criteria:

- the mean OD value in the conjugate control wells (OD_{cc}) does not exceed 0,15;
- the mean value of the optical density (OD) of the negative control (C-) does not exceed 0,2;

- the average OD of the positive control OD (C+) is not less than 1,0;

If the obtained values of OD in wells with control samples do not meet the validation criteria, the test results are not considered. The assay is repeated.

To evaluate the results of the analysis, the critical level of optical density (OD_{crit.}) is calculated:

$$OD_{crit.} = OD (C-) + 0,25$$

0,25 - coefficient determined by the method of statistical processing of research results at the manufacturer:

If the OD of the test sample is less than the OD_{crit.}, the sample is considered negative. Antibodies to the FMD virus type A are not detected.

If the OD of the test sample is higher than or equal to OD_{crit.}, the test result of the sample is considered positive. Antibodies to FMD virus type A are detected.

If positive results are obtained, further titration is carried out as necessary by successive twofold dilutions with DBS-S solution. The sera titer is the last sera dilution with an OD higher than the OD_{crit.}

Study of diagnostic sensitivity and specificity:

In order to assess the sensitivity and specificity of the reagent kit for detection of antibodies to FMD type A, a study was conducted using ELISA of 994 sera from different animals (cattle-564, sheep and goats-246, pigs-184). In addition, a comparative evaluation of the developed test with a commercial ELISA kit on the market of Kazakhstan was carried out.

- Reagent kit for detection of FMD virus type A antibodies by ELISA method (MVA Group Research and Development Center LLP, Republic of Kazakhstan).

- VPro® FMDV ELISA - Kit for detection of antibodies to FMD virus serotypes A (MEDIAN Diagnostics, Inc., Republic of Korea).

- PrioCHECK® FMDV ELISA - ELISA for the in vitro detection of antibodies against FMD virus in sera of cattle, sheep, goats and pigs (Prionics AG, Switzerland).

All tests were performed according to the manufacturer's instructions.

Results:

Tables 1-2 show the sensitivity and specificity of the kit developed by «MVA Group R&D Center» LLP for the presence of antibodies to FMD virus type A in the study of 564 cattle sera.

Table 1 - Sensitivity and specificity of the kit of «MVA Group R&D Center» LLP in 564 cattle sera samples

Kit	Results	Sensitivity	Specificity	Total
«MVA Group R&D Center» LLP	positive	399	118	517
	negative	44	3	47
	Total:	443	121	564

Table 2 - Percentage of positive results from 564 cattle sera samples

Kit	Positive	Percentage
«MEDIAN Diagnostics, Inc.»	404/443	91,19%
«MVA Group R&D Center» LLP Group»	399/443	90,06%
«Prionics AG»	387/443	87,35%

The sensitivity of the proposed kit for the determination of antibodies to FMD virus type A in cattle sera was 90,06% (399/443).

The specificity of the kit for the determination of antibodies to FMD virus type A in cattle sera was 97,5% (118/121).

Tables 3-4 show the sensitivity and specificity of the kit developed by «MVA Group R&D Center» LLP for the presence of antibodies to FMD virus type A in the study of 246 sheep and goats' sera.

Table 3 - Sensitivity and specificity of the kit of «MVA Group R&D Center» LLP in 246 sheep and goats' sera samples

Kit	Results	Sensitivity	Specificity	Total
«MVA Group R&D Center» LLP	positive	110	119	229
	negative	13	4	17
	Total:	123	123	246

Table 4 - Percentage of positive results from 246 sheep and goats' sera samples

Kit	Positive	Percentage
«MEDIAN Diagnostics, Inc.»	107/123	86,99%
«MVA Group R&D Center» LLP Group»	110/123	88,4%
«Prionics AG»	105/123	85,36%

The sensitivity of the proposed kit for the determination of antibodies to FMD virus type A in sheep and goats' sera was 88,4% (110/123).

The specificity of the kit for the determination of antibodies to FMD virus type A in sheep and goats' sera was 96,7% (119/123).

Tables 5-6 show the sensitivity and specificity of the kit developed by «MVA Group R&D Center» LLP for the presence of antibodies to FMD virus type A in the study of 184 pig sera.

Table 5 - Sensitivity and specificity of the kit of «MVA Group R&D Center» LLP in 184 pig sera samples

Kit	Results	Sensitivity	Specificity	Total
«MVA Group R&D Center» LLP	positive	83	89	172
	negative	9	3	12
	Total:	92	92	184

Table 6 - Percentage of positive results from 184 pig sera samples

Kit	Positive	Percentage
«MEDIAN Diagnostics, Inc.»	81/92	88,04%
«MVA Group R&D Center» LLP Group»	83/92	90,2%
«Prionics AG»	87/92	94,56%

The sensitivity of the proposed kit for the determination of antibodies to FMD virus type A in pig sera was 90,2% (83/92).

The specificity of the kit for the determination of antibodies to FMD virus type A in pig sera was 96,7 % (89/92).

Conclusion

The results of the study, lead to the following conclusions:

E. coli EN2566/pET/VP1, a bacterial strain expressing the VP1 structural protein of foot-and-mouth disease virus type A was obtained. The specificity of recombinant protein A was

confirmed by Western blotting. Optimal conditions of expression and purification of recombinant viral proteins were determined, allowing to obtain preparations with purity not less than 95%.

Type A sera suitable for use in indirect ELISA were obtained.

- The optimal conditions of indirect ELISA for detection of antibodies to FMD virus type A were developed.

The sensitivity of the test system for detection of antibodies to FMD virus type A was 90,06% (399/443) in cattle sera, 90,2% (83/92) in pigs sera, 88,4% (110/123) in sheep and goats' sera.

The specificity of the kit in detecting antibodies to FMD virus type A was 97,5% (118/121) in cattle sera, 96,7% (89/92) in pig sera, and 96,7% (119/123) in sheep and goats' sera.

Thus, a study of the sensitivity and specificity of the proposed ELISA kit for the detection of antibodies to FMD virus type A compared to other commercial ELISA kits showed that the kit has significantly higher sensitivity and specificity in samples from cattle, pigs, sheep and goats.

References:

- 1 Hedger R.S. (1981). Foot-and-mouth disease. In *Infectious Diseases of Wild Animals*, 2nd edn, pp. 87-96. Edited by Davis J.W., Karstad L.H. & Trainer D.O. Ames, IA: Iowa State University Press
- 2 Jamal, S.M., Belsham, G.J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 44, 116 (2013). (<https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-116>)
- 3 Knowles NJ, Samuel AR. 2003. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 91:65–80., Samuel A. R. and Knowles N. J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *Journal of General Virology* (2001), 82, 609–621. (doi: 10.1016/s0168-1702(02)00260-5.)
- 4 Clavijo A. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. Clavijo A., Wright P., Kitching. P., *Vet J.*, 2004, V.167, p.9-22 ([https://doi.org/10.1016/s1090-0233\(03\)00087-x](https://doi.org/10.1016/s1090-0233(03)00087-x))
- 5 Orynbaev M.B., Zakar'ja K.D., Hajrullin B.M., Kerimbaev A.A., Omarova Z.D., Kopeev S.K., Strochkov V.M., Sultankulova K. Molekuljarnaja jepidemiologija jashhura v Respublike Kazahstan v 2011-2013gg. *Biotehnologija i biobezopasnost'* №6 2021g s. 19-30 (<https://journal.biosafety.kz/jour/issue/viewIssue/6/5>)
- 6 FAO World Reference Laboratory for FMD Genotyping Report. Report on FMDV O in Kazakhstan in 2022 (<https://www.wrlfmd.org/country-reports/country-reports-2022>)
- 7 Mukantayev K.N., Shustov A.B., Sydyknabi I., Inerbay B., Bigalyeva A., Mukanov K.K., Immunofermentnyj analiz na osnove rekombinantnogo VP1 antigena dlja serologicheskoy diagnostiki jashhura. *Biotehnologija. Teorija i praktika*. 2014, №2, str. 36-41
- 8 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem*, 1976, Vol. 72, № 1-2, p. 248-254 (<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>)

А.А. МЫРЗАХМЕТ^{1,2*}, Т.Д. МУКАШЕВА², Т.И. ДАВЛЯТШИН¹, Б.М. ХАЙРУЛЛИН¹,
А.М. НАМЕТ¹, Г.Ж. САРСЕНБАЕВА¹, Д.А. ИНКАРБЕКОВ¹, С.М. БАРМАК^{1,2},
Т.Т. ДАВЛЯТШИН³, А.А. СИЗОВ⁴, Г.С. АУБАКИРОВА⁵, М.Б. ОРЫНБАЕВ¹

¹Научно-исследовательский производственный центр MVA Group, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

³Казахстанско-Российский медицинский университет, Алматы, Казахстан

⁴Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук,
Новосибирск, Российская Федерация

⁵Национальный референтный центр по ветеринарии, Астана, Казахстан

*e-mail: A_00_00@mail.ru

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЯЩУРА ТИПА А МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Аннотация

В данной статье представлена разработка инновационной технологии изготовления наборов реагентов для выявления антител к вирусу ящура типа А с использованием метода иммуноферментного анализа. Вирус ящура типа А имеет значительное медицинское и ветеринарное значение, и эффективные методы диагностики играют важную роль в его контроле и противодействии распространению.

Процесс разработки технологии включает в себя выбор оптимальных антител-маркеров, оптимизацию условий антиген-антитело взаимодействия, а также определение подходящего носителя реагентов. В результате была создана эффективная методика, обеспечивающая высокую чувствительность и специфичность при детекции антител к вирусу ящура типа А.

В статье подробно описаны этапы разработки, включая химические и биохимические методы модификации реагентов, исследование их стабильности и активности. Также представлены результаты валидации технологии на панели клинических образцов, что подтверждает высокую точность и надежность разработанной методики.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о перспективности разработанной технологии для применения в медицинских и ветеринарных лабораториях, а также в научных исследованиях в области вирусологии. Новая методика может существенно улучшить диагностику и контроль вируса ящура типа А, способствуя эффективным мерам по его предотвращению и борьбе с распространением.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, ящур, антитела, антиген, реагент.

FTAMP: 62.41.09, 62.41.31

А.А. МЫРЗАХМЕТ^{1,2*}, Т.Д. МУКАШЕВА², Т.И. ДАВЛЯТШИН¹, Б.М. ХАЙРУЛЛИН¹,
А.М. НАМЕТ¹, Г.Ж. САРСЕНБАЕВА¹, Д.А. ИНКАРБЕКОВ¹, С.М. БАРМАК^{1,2},
Т.Т. ДАВЛЯТШИН³, А.А. СИЗОВ⁴, Г.С. ӘУБӘКІРОВА⁵, М.Б. ОРЫНБАЕВ¹

¹MVA Group Ғылыми зерттеу өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

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

³Қазақстан-Ресей медициналық университеті, Алматы, Қазақстан

⁴Ресей ғылым академиясының Сібір федералды агроботехнологиялар ғылыми орталығы,
Новосибирск, Ресей Федерациясы

⁵Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық, Астана, Қазақстан

*e-mail: A_00_00@mail.ru

ИММУНОФЕРМЕНТТІК ТАЛДАУ ӘДІСІ БОЙЫНША А ТИПТІ АУСЫЛ ВИРУСЫНА АНТИДЕНЕЛЕРДІ АНЫҚТАУҒА АРНАЛҒАН РЕАГЕНТТЕРДІ ӨНДІРУ ТЕХНОЛОГИЯСЫН ӘЗІРЛЕУ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.12

Түйін

Бұл мақалада иммундық ферментті талдау әдісін қолдана отырып, А типті аусыл вирусына қарсы антиденелерін анықтауға арналған реагенттер жиынтығын жасаудың инновациялық технологиясын әзірлеу ұсынылған. А типті аусыл вирусы медициналық және ветеринариялық маңызы бар және тиімді диагностикалық әдістер оны бақылауда және таралуының алдын алуда маңызды рөл атқарады.

Технологияны әзірлеу процесі оңтайлы маркерлік антиденелерді таңдауды, антиген-антидене әрекеттесу шарттарын оңтайландыруды және сәйкес реагент тасымалдаушыны анықтауды қамтиды. Нәтижесінде А типті аусыл вирусына қарсы антиденелерін анықтауда жоғары сезімталдық пен ерекшелікті қамтамасыз ететін тиімді әдістеме жасалды.

Мақалада реагенттерді өзгертудің химиялық және биохимиялық әдістерін, олардың тұрақтылығы мен белсенділігін зерттеуді қамтитын даму кезеңдері егжей-тегжейлі сипатталған. Клиникалық үлгілер панеліндегі технологияны тексеру нәтижелері де ұсынылған, бұл әзірленген әдістеменің жоғары дәлдігі мен сенімділігін растайды.

Алынған нәтижелер әзірленген технологияның медициналық және ветеринариялық зертханаларда, сондай-ақ вирусология саласындағы ғылыми зерттеулерде пайдалану үшін перспективалы екендігі туралы қорытынды жасауға мүмкіндік береді. Жаңа әдістеме А типті аусыл вирусының диагностикасын мен бақылауды айтарлықтай жақсарта отырып, оның таралуын болдырмау және бақылау бойынша тиімді шараларға ықпал етеді.

Кілтті сөздер: иммундық ферментті талдау, аусыл, антидене, антиген, реагент.

Аусыл - үй және жабайы қостұяқты жануарларға әсер ететін өте жұқпалы вирустық ауру [1]. Ауру эпизоотия тудыруы және мал шаруашылығына үлкен экономикалық зиян келтіруі мүмкін трансшекаралық аурулар санатына жатады.

Патоген РНК құрамында Aphthovirus тұқымдасына жататын Picornaviridae жанұясының вирусы бар. Аусылдың жеті иммунологиялық әр түрлі серотиптері бар (О, А, С, Азия 1, SAT 1, SAT 2 және SAT 3) [2]. Аусыл вирусының серотиптері бастапқыда жануарларға қарсы иммунитет эксперименттерінде анықталды. Бір серотипті жұқтырудан айыққан жануар сол серотипті жұқтыруға төзімді екендігі дәлелденді, ол әлі де кез келген басқа серотипті жұқтыруға сезімтал. Аусылдың әртүрлі серотиптері белгілі бір географиялық аймақтарда жиі кездеседі. Сонымен, Азияда А, О және Азия-1 серотиптері жиі кездеседі, Еуропа мен Оңтүстік Америкада А, О және С серотиптері кездеседі, ал Африкада А, О және SAT серотиптері басым. Барлық серотиптер бір-бірінен клиникалық тұрғыдан ажыратылмайды, бірақ олардың географиялық таралуы, генетикалық және антигендік

қасиеттері бойынша айырмашылықтары бар. Бұл тұрақты генетикалық топтар топотиптер (географиялық типтер) деп аталды. Әр топотипте аусыл вирусының көптеген генетикалық сызықтары бар [3].

Вирус геномы төрт құрылымдық және сегіз құрылымдық емес ақуызды кодтайды. Ақуыздардың екі тобы да инфекция кезінде жануарларда антиденелер өндірісін тудырады. Аусыл инфекциясынан кейін құрылымдық ақуыздарға және құрылымдық емес ақуыздарға арнайы антиденелер (IgG және/немесе IgM, IgA) пайда болады. Антидене титрлері уақыт өте келе тез өседі және жоғары болып қалады. Осылайша, үлгіде аусылға арнайы антиденелердің болуы үлгіні алған жануардың аусыл вирусымен байланыста болғанын немесе вакцинацияланғанын көрсетеді. Аусылмен ауыратын жануарларда құрылымдық және құрылымдық емес ақуыздарға антиденелер түзіледі, ал вакцинацияланған жануарларда негізінен құрылымдық ақуыздарға антиденелер анықталады. Бұл вакцинаны жасау кезінде вирустың ішінара тазартылуымен түсіндіріледі, оның барысында құрылымдық емес ақуыздардың көпшілігі жасушалық дебриспен бірге жойылады [4].

Аусылдың бастапқы диагнозы әдетте зардап шеккен жануарлардағы типтік клиникалық белгілерді тануды қамтиды. Аусылдың клиникалық белгілері барлық түрлерде бірдей, бірақ олардың ауырлығы айтарлықтай өзгеруі мүмкін. Аусылдың клиникалық белгілері аусыл инфекциясының сенімді көрсеткіші емес өйткені кейбір жағдайларда күйіс қайыратын жануарлардағы аусыл аурудың клиникалық көріністерінсіз жүруі мүмкін. Мұндай тасымалдаушы жануарлар аурудың жаңа ошақтарының көзі болып табылады. Осылайша, жануарларды аусылға қарсы вакцинациялау жүргізілмейтін аймақтарда симптомсыз аусылмен ауыратын жануарларды анықтайтын жылдам серологиялық әдісті әзірлеу қажет. Сонымен қатар, жануарларды аусылға қарсы профилактикалық иммундау жүргізілетін аймақтарда вакцинацияның тиімділігін анықтайтын тест қажет.

ИФТ жоғары сезімталдықпен, орнатудың қарапайымдылығымен, нәтижелерді өлшеу дәлдігімен және жауап алу жылдамдығымен сипатталады. Сонымен қатар, ИФТ ерекшелігі бойынша аусыл вирусының антигендерін анықтау кезінде басқа иммунохимиялық әдістермен корреляцияланады және сезімталдығы бойынша олардан бірнеше есе асып түседі.

Қазіргі уақытта ветеринариялық диагностикалардың әлемдік нарығында аусыл вирусының құрылымдық ақуыздарына антиденелерді анықтауға арналған бірнеше коммерциялық тест-жүйелер ұсынылған: «PrioCHECK™ FMDV Type A Antibody ELISA Kit, strip», «ID Screen® FMD Type A Competition», «VDPPro ® FMDV Type A ELISA». Барлық қолданыстағы аналогтар бәсекеге қабілетті ИФТ әдісіне негізделген.

Қазақстан Республикасы үшін бұл аурудың іргелес мемлекеттерден ену қаупі үнемі бар, бұған Қытай мен Қырғызстаннан инфекцияның әкелінуінен туындаған 2011-2013 жылдары Қазақстан аумағында аусыл ауруының өршуі дәлел болып табылады [5]. Ұзақ әл-ауқаттан кейін 2021 жылы аусыл Қарағанды облысының шаруашылықтарында анықталды [6]. Бұл жағдайда аусыл диагностикасының құралдары мен әдістерін әзірлеу және жетілдіру елдің биологиялық қауіпсіздігін қамтамасыз ету проблемасымен тікелей байланысты. Мәселенің өзектілігіне қарамастан, қазіргі уақытта Қазақстан Республикасында вакцинацияланған және ауырған жануарлардың қан сарысуларында аусыл вирусына антиденелерді анықтауға арналған отандық жиынтықтар жоқ.

Қазақстанда аусыл вирусына қарсы антиденелерді анықтау үшін тест-жүйелер әзірленбеген. Сондықтан, Қазақстан Республикасының қажеттіліктерін қамтамасыз ету үшін аса қауіпті және әлеуметтік маңызы бар ауруларға қарсы вакциналар мен диагностикалардың отандық өндірісін құру мемлекетті дамытудың маңызды міндеті болып табылады. Аусыл вирусына қарсы антиденелерді анықтауға арналған тест-жүйелерді әзірлеу осы экономикалық маңызды аурумен күресудің басты кепілдерінің бірі болып табылады. Жобаны іске асыру аусыл ауруын диагностикалаудың тиімді құралын әзірлеуге мүмкіндік береді, бұл елдегі эпизоотиялық әл-ауқатқа ықпал етеді.

Материалдар мен әдістер

ИФА әдісімен аусыл вирусының А типіне антиденелерді анықтауға арналған реагенттер жинақтарын жасау жұмысында мыналар пайдаланылды:

- 96 ұяшықты планшет (8 ұяшық x 12 қатар).

Әр қатар 8 ұяшықтан, ал планшет 12 қатардан тұрады. Әрбір ұяшық алдын ала А типті аусыл вирусының рекомбинантты VP1 антигенімен қапталған. Ұяшықтар мөлдір пластиктен жасалған. Планшеттің сол жақ шетінде А–Н әріптері алфавиттік ретпен тігінен орналасқан. 1-12 араб цифрлары планшеттің төменгі жиегіне көлденең орналасқан. Планшеттің оң жақ жиегіне сериялық нөмірі мен өнім атауы бар штрих-код қойылады.

- теріс бақылау сарысуы: ерітінді түрінде (түссіз немесе ашық сары сұйықтық) немесе лиофилденген (кұрғақ кеуекті таблетка түрінде), бөлшектері жоқ.

- оң бақылау сарысуы: ерітінді түрінде (түссіз немесе ашық сары сұйықтық) немесе лиофилденген (кұрғақ кеуекті таблетка түрінде), бөлшектері жоқ.

- Жуу ерітіндісі (25X концентрілі): мөлдір, аздап күңгірт, түссіз сұйықтық, заттаңбасы бар мөлдір пластик бөтелкедегі, бөлшектері жоқ.

- Конъюгат ерітіндісі (КГЕ): заттаңбасы бар қоңыр шыны бөтелкедегі, бөлшектері жоқ мөлдір жасыл сұйықтық.

- Сарысуды сұйылтуға арналған буферлік ерітіндісі (ССБ-Е): жапсырмасы бар мөлдір пластик бөтелкедегі, бөлшектері жоқ мөлдір көк сұйықтық.

- ТМБ-субстрат: заттаңбасы бар пластикалық қоңыр бөтелкедегі, бөлшектері жоқ мөлдір түссіз сұйықтық.

- Тоқтатқыш реагент: заттаңбасы бар мөлдір пластик бөтелкедегі, бөлшектері жоқ мөлдір, түссіз сұйықтық.

- Жабысқақ пленка: төртбұрышты мөлдір полиэфирлі пленка.

- Қауіпсіздік талаптарына сәйкес зертханалық жабдық.

- Өте таза су: ISO 3696:1987 (Е) стандартына сәйкес кем дегенде 3 су класына баламалы.

- Бір арналы пипетка (20 – 200 мкл).

- Көп арналы пипетка (5 – 50 мкл).

- Көп арналы пипетка (50 – 300 мкл).

- Пипетка ұштары (пипеткаларды өндірушінің ұсынымдарына сәйкес).

- Ерітінді ыдыстары.

- Шұңқыр.

- Қан жинауға арналған арнайы түтіктер.

- Multiscan EX планшеттерді талдау құрылғылары.

Құрылғы 450 нм планшеттерді оқуға арналған тиісті сүзгі жинағымен жабдықталған.

- Тесан ЕІА планшет жуу машинасы.

- рЕТ-26b(+) экспрессиялық плазмидасын трансформациялау арқылы алынған А типті аусыл вирусының құрылымдық ақуыз антигенінің VP1 генін тасымалдаушы Escherichia coli ER2566/pET/VP1-А штаммы.

FMD A_pET-26b(+) плазмидалары GenScript Biotech Pte LTD (Singapore) компаниясынан алынды (www.genscript.com).

Сарысуды алу үшін салмағы 2,5-3,0 кг қояндар қолданылды.

Жануарлардың 994 сарысуы зерттелді.

- Ірі қара мал (ІҚМ): 564 сынама

- Ұсақ мал (ҰМ): 246 сынамалар

- Шошқалар: 184 сынамалар

Салыстырмалы зерттеулер үшін:

- VDPPro® FMDV Type A ELISA - Аусыл вирусының А серотипіне қарсы антиденелерді анықтауға арналған жинақтар, «MEDIAN Diagnostics, Inc.» өндірушісі (Республика Корея), 1FMDA22001 сериясы, 01.03.2021 жылға дейін жарамды.

- PrioCHECK™ FMDV Type A Antibody ELISA Kit - Ірі қара малдың, қойдың, ешкі мен шошқаның сарысуында аусыл вирусына қарсы антиденелерді *in vitro* анықтауға арналған ИФА, «Prionics AG» (Швейцария) өндірушісі, сериясы FA 201101L, 31.05.2021 жылға дейін жарамды.

- Эксперименталды сериялар ИФА әдісімен А типті аусыл вирусына қарсы антиденелерін анықтауға арналған реагенттер жинағы, «MVA Group ҒЗӨО» ЖШС (Қазақстан Республикасы) өндірушісі, сериясы 05, 12.03.2023 жылға дейін жарамды.

Зерттеу нәтижелері және оны талдау

А типті аусыл вирусының рекомбинантты VP1 антигенін алу:

Рекомбинантты ақуызды алу үшін аусыл вирусының А типті құрылымдық ақуызының антигенінің VP1 генін алып жүретін рЕТ-26b(+) плазмидінің экспрессиясын түрлендіру арқылы алынған *Escherichia coli* ER2566/рЕТ/VP1-А штаммы пайдаланылды.

Мақсатты ақуыздардың экспрессия жағдайларын оңтайландыру үшін өсіру шарттары пысықталды. *Escherichia coli* құзыретті жасушалары LB ортасында (триптон - 10 г, ашытқы сығындысы - 5 г, NaCl - 5 г, 1000 мл-ге дейін тазартылған су, 50 мкг/мл канамицин, рН 7,5) 37°C температурада, 18-24 сағат ішінде OD600=0,6~0,8 дейін өсірілді. Содан кейін ген экспрессиясын индукциялау үшін 0,2 мМ концентрацияда изопропил-β, D-тиогалактопиранозид қосылды. Индукторды қосқаннан кейін жасушалар 6 сағат бойы 30°C температурада өсірілді.

Әрбір рекомбинантты ақуыз үшін тазалық дәрежесі 95% - дан төмен емес ақуыздың максималды шығымдылығын қамтамасыз ететін тазарту шарттары таңдалды. Жинақталған химерикалық рекомбинантты ақуызы бар *Escherichia coli* жасушалары 20 минут ішінде 3000g-де центрифугалау арқылы тұндырылды, тұнба тұзды ерітіндінің 1/3 бөлігімен жуылды, 3000g-де 20 минут центрифугаланды және металл-аффиндік хроматография үшін 10-30 мл буферге қайта суспензияланды (25 мм натрий-фосфат рН 7,4 буфері, 400мм NaCl, 20мм имидазол). Жасушалар ультрадыбыспен жойылды (22 кГц, 4 рет 20 секунд), ерімейтін фракция 45 минут ішінде 50000g центрифугалау арқылы бөлінді. Ерімейтін фракция (тұнба) 8м мочевины бар металл-аффиндік хроматографияға арналған 10 см³ 25 мМ буферге қайта суспензияланды, магниттік араластырғышта 1 сағат инкубацияланды, содан кейін 45 минут ішінде 50000g центрифугаланды. Осылайша алынған тазартылған лизат Нейлон сүзгісі арқылы сүзіліп (тері тесігінің диаметрі 0,45 мкм) және металл-аффиндік хроматографияға ұшырады. Рекомбинантты ақуыз HisTrap бағанында тазартылды (Amersham, АҚШ). Элюция буфермен жүргізілді (25мМ натрий-фосфат буфері рН 7,4, 400мМ NaCl, 200мМ имидазол, 8мМ мочевины). Рекомбинантты ақуыздың ренатурациясы диализ арқылы 25 мМ натрий-фосфат рН 7,25 буферінің 300 мМ NaCl көлеміне қарсы жүргізілді. Ренатуратталған ақуыз 15% полиакриламидті гель (ПААГ) денатураттайтын электрофорез арқылы талданды [7].

Рекомбинантты рЕТ/VP1-а плазмидаларымен түрлендірілген EN2566 *E. coli* бактериялық жасушаларының индукциясы нәтижесінде молекулалық салмағы VP1 геніне есептелген ақуыздардың экспрессиясы анықталды және 34 кДа құрады.

Тазартылған рекомбинантты антиген концентрациясын анықтау Брэдфорд әдісімен жүргізілді [8]. А типті аусыл вирусының рекомбинантты VP1 антигенінің максималды концентрациясы 500 мкг/мл құрады.

Өндірістік штаммды криоконсервациялау LB, 20% глицерин, 10% сахароза, 10% поливинилпирролидон, 109 КОЭ/мл жасуша концентрациясы арқылы жүргізілді.

Өндірістік штаммды лиофилизациялау үшін 1:1 қатынасында қорғаныш ортасы, 109 КОЭ/мл жасуша концентрациясы пайдаланылды.

Лиофильді кептірілген штамм +8°C жоғары емес температурада, ал криоконсервіленген үлгілер -80°C температурада сақталады.

Теріс бақылау сарысуын алу:

Теріс бақылау сарысулары клиникалық сау (вакцинацияланбаған және ауру емес) және аусыл вирусына антиденелері жоқ ірі қара малдан алынды. Қан ұйығышын бөлу үшін жеке қан үлгілерін алдымен 36-38°C температурада 30-60 минут, содан кейін 2-8°C бір тәулік ұстады. Тұндырылған қан сарысуының жеке үлгілері ИФА антиденелерінің болуына тексерілді. Осыдан кейін жеке үлгілерді араластыру арқылы серия дайындалды. Мұқият араласқан сарысу қоспасы 0,2 мкм сүзгі арқылы сүзілді.

Жинақтың құрамына сарысу сұйық немесе лиофилизацияланған түрде ұсынылуы мүмкін.

Нативті сарысуды сақтау және орау:

Проклин (0,05%) консервант ретінде қосылды. Алынған препарат 1,0 см³ флакондарға оралған.

Лиофилизацияланған сарысуды дайындау:

Сарысулар құтыларға салынған және лиофилизацияға дейін (5±1)°C температурада 3 күннен аспайтын мерзімде сақталды. Сарысуды лиофилизациялау жұмыс камерасындағы қалдық қысымда шамамен 50 мкм және конденсат температурасы минус (50±5)°C кезінде вакуумды кептіргіште жүргізілді. Қыздыру температурасы 30-дан 35°C-қа дейін сақталады. Сублимация кезеңінің соңында қыздыру 45°C дейін көтеріледі. Материалдағы тұрақты температурада (14-20)°C соңғы кептіру шамамен 8 сағатқа созылады. Бүкіл кептіру процесінің ұзақтығы 20-28 сағатты құрайды. Флакондар вакуумда (450-500 мкм) тығындармен жабылған. Дайындаудағы ылғалдың үлесі 4% аспауы керек.

Сарысулар 2-8°C температурада сақталады.

Оң бақылау сарысуын өндіру:

Сарысуды алу үшін салмағы 2,5-3,0 кг қояндар пайдаланылды. Гипериммунизация үшін А типті аусыл вирусына рекомбинантты антигені және адьювантты қамтитын препарат пайдаланылды. Адьювант ретінде сапонин, оның аналогтары немесе толық емес Фрейд адьюванты сияқты майлы адьюванттар пайдаланылды. Алынған препаратты қояндардың артқы аяқтарының сан аралық тіндеріне 1-2 см³ (әрбір енгізу нүктесінде 0,1-0,2 см³) енгізді. 28 күннен кейін қояндарға көмекші зат ретінде 2,5 мг сапонин қосып 2-5 см³ көлеміндегі рекомбинантты антигеннің бастапқы препаратының қосарланған дозасымен жамбас аймағына бұлшықет ішіне қайтадан вакцина егілді. 10 күннен кейін жануарлардан қан алынып, қан сарысуы алынды.

Қан ұйығышын бөлу үшін жеке қан үлгілерін алдымен 36-38°C температурада 30-60 минут, содан кейін 2-8°C бір тәулік ұстады. Тұндырылған жеке қан сарысу үлгілері ИФА-мен түр ерекшелігі мен белсенділігіне сыналған. Осыдан кейін, бір белсенділіктің типке тән жеке үлгілерін араластыру арқылы серия дайындалды. Мұқият араласқан сарысу қоспасы 0,2 мкм сүзгі арқылы сүзілді.

Жинақтың құрамына сарысу сұйық немесе лиофилизацияланған түрде ұсынылуы мүмкін.

Нативті сарысуды сақтау және орау:

Проклин (0,05%) консервант ретінде қосылды. Алынған препарат 1,0 см³ флакондарға оралған.

Лиофилизацияланған сарысуды дайындау:

Сарысулар құтыларға салынған және лиофилизацияға дейін (5±1)°C температурада 3 күннен аспайтын мерзімде сақталды. Сарысуды лиофилизациялау жұмыс камерасындағы қалдық қысымда шамамен 50 мкм және конденсат температурасы минус (50 ± 5)°C кезінде вакуумды кептіргіште жүргізілді. Қыздыру температурасы 30-дан 35°C-қа дейін сақталады. Сублимация кезеңінің соңында қыздыру 45°C дейін көтерілді. Материалдағы тұрақты температурада (14-20)°C, соңғы кептіру шамамен 8 сағатқа созылады. Бүкіл кептіру процесінің ұзақтығы 20-28 сағатты құрайды. Флакондар вакуумда (450-500 мкм) тығындармен жабылған. Дайындаудағы ылғалдың үлесі 4% аспауы керек.

Сарысулар 2-8°C температурада сақталады.

Ферменттің конъюгатын өндіру:

- желкек пероксидазасымен конъюгацияланған, жануар IgG-ге тышқанның моноклоналды антиденелерінің ерітіндісін дайындады.

- Консервант ретінде сиыр сарысуындағы альбумин проклинмен (0,05%) араластырылды.

- Бөтелкеге құйылады және 2-8°C температурада сақталады.

Фермент конъюгатының сұйылтқышының өндірісі

- Натрий фосфатты буфері мен проклин (0,05%) дайындалды.

- Бөтелкеге құйылады және 2-8°C температурада сақталады.

Жуу ерітіндісін өндіру (25X концентрі)

- Дайындалған натрий фосфатты буфері-Tween 20 (10x концентренген) және Proclin (0,05%).

- Бөтелкеге құйылады және 2-8°C температурада сақталады.

ТМБ-субстрат өндірісі

- Тетраметилбензидин субстратының сутегі асқын тотығымен араластырылған ерітіндісі дайындалады.

- Бөтелкеге құйылады және 2-8°C температурада сақталады.

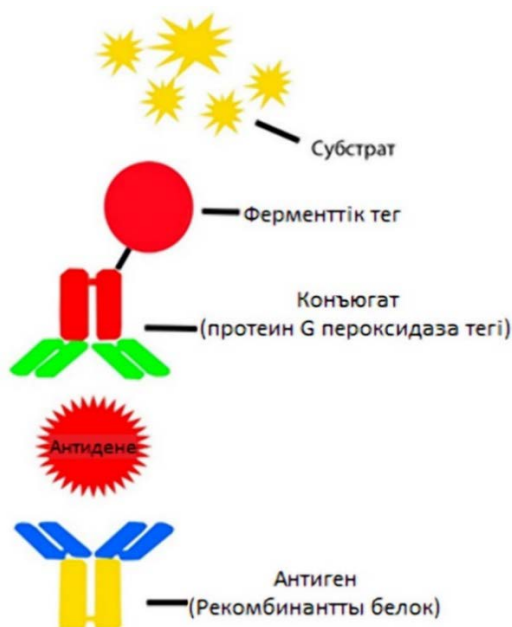
Тоқтату реагент ерітіндісін өндіру

- 1N күкірт қышқылын дайындалды

- Бөтелкеге құйылады және 2~8°C температурада сақталады.

Иммуноферменттік талдау жүргізу

Зерттеулер барысында антиденелерді анықтауға жарамды ИФТ нұсқасын таңдау бойынша болды. Эксперименттік жұмыстардың нәтижесінде ИФТ-ның жанама нұсқасы ең маңызды екендігі анықталды. Әдістің мәні-қатты фазада адсорбцияланған аусыл вирусының рекомбинантты антигені спецификалық антиденелермен әрекеттеседі. Алынған иммундық кешен G протеинінің конъюгацияланған желкек пероксидазасымен және хромогендік субстрат көмегімен анықталады. Әдістің мәні 1-2 суретте көрсетілген.



1 сурет - Қатты фазалы ИФТ жанама нұсқа схемасы

ИФТ қою шарттары:

1) Планшеттің А1 және В1 ұяшықтарына 100 мкл оң бақылау, С1 және D1 ұяшықтарына 100 мкл теріс бақылау енгізу.

2) Планшеттің қалған ұяшықтарына сарысуларды сұйылту үшін 80 мкл буферлік ерітінді (ССБ-Е) қосыңыз.

3) Сарысуды сұйылтуға арналған буферлік ерітіндісі (ССБ-Е) бар планшеттің ұяшықтарына 20 мкл/ұяшық көлеміндегі сынақ үлгілерін (сарысу немесе плазма) енгізіңіз және пипетка арқылы араластырыңыз. Соңғы сұйылту қатынасы 1:5 құрайды. Үлгілерді ұяшықтан ұяшыққа төгіп алмау үшін абай болыңыз.

4) Планшетті қақпақпен немесе жабысқақ таспамен жауып, +37°C температурада 30 минут инкубациялаңыз.

5) Планшеттің әрбір ұяшығын 1X жуу буферімен 5 рет жуыңыз (әр ұяшыққа кемінде 250 мкл), әр жуу қадамында ұяшықтардың ішіндегісін алып тастаңыз. Соңғы жуудан кейін ұяшықтардан артық ерітіндіні кетіру үшін планшетті қағаз сүлгіге аударыңыз.

6) Планшеттің әр ұяшығына 100 мкл конъюгат ерітіндісін қосыңыз.

7) Планшетті жабыңыз және 37°C температурада 30 минут инкубациялаңыз.

8) Планшеттің әрбір ұяшығын 5-тармақта көрсетілгендей шайыңыз.

9) Планшеттің әрбір ұяшығына 100 мкл ТМБ-субстрат қосыңыз.

10) Қараңғы жерде бөлме температурасында (18-25°C) 15 минут инкубациялаңыз.

11) Планшеттің әрбір ұясына 50 мкл тоқтату реагентін қосыңыз..

12) 450nm толқын ұзындығында бихроматикалық спектрофотометрмен ұяшықтардың сіңіру қабілетін өлшеңіз. Нәтижелерді интерпретациялау талдау аяқталғаннан кейін 10 минут ішінде аяқталуы тиіс. Нәтижелерді оқымас бұрын көпіршіктердің толығымен жойылуын күтіңіз.

ИФТ қою схемасы 2 суретте көрсетілген.

2-сурет – бақылау және сыналатын сынамалардың орналасу сызбасы

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ОБ+	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
B	ОБ+	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
C	ТБ-	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
D	ТБ-	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
E	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
F	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
G	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
H	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
Ескертпелер: «ОБ+» – оң бақылау; «ТБ-» – теріс бақылау; «1-92» – сыналатын үлгілер												

Нәтижелерді есепке алу және интерпретациялау

Өлшеу алдында фотометрдің «0» мәнін ауа арқылы орнатыңыз.

Реакция нәтижелері сенімді болып саналады және есепке алынуы мүмкін егерде, бақылау индикаторлары критерийлерге сәйкес келсе:

- конъюгаттық бақылауы бар ұяшықтарда ОТ-ның орташа мәні (ОТкб) 0,15-тен аспайды;

- орташа мәні оптикалық тығыздық (ОТ) теріс бақылау (ТБ-) 0,2 аспайды;

- оң бақылау ОТ (ОБ+) орташа мәні 1,0-ден кем емес;

Егер бақылау үлгілері бар ұяшықтардағы алынған ОТ мәндері валидация критерийлеріне сәйкес келмесе, тест нәтижелері ескерілмейді. Зерттеулер қайта жүргізіледі.

Талдау нәтижелерін бағалау үшін оптикалық тығыздықтың критикалық деңгейі есептеледі (ОТкрит.):

$$\text{ОТкрит.} = \text{ОТ (ТБ-)} + 0,25$$

0,25 - өндіруші кәсіпорындағы зерттеу нәтижелерін статистикалық өңдеу әдісімен анықталған коэффициент.

Егер сыналатын үлгінің ОТ ОТкрит-тен аз болса, үлгіні зерттеу нәтижесі теріс деп саналады. А типті аусыл вирусына антиденелер табылған жоқ.

Егер сыналатын үлгінің ОТ ОТкрит-тен үлкен немесе оған тең болса, үлгіні зерттеу нәтижесі оң деп саналады. А типті аусыл вирусына антиденелер табылды.

Оң нәтижелерді алғаннан кейін, қажет болған жағдайда, оларды одан әрі титрлеу ССБ-Е ерітіндісімен екі ретті сұйылту арқылы жүзеге асырылады. Қан сарысуының титрі - ОТ ОТкрит.-тен асатын сарысудың соңғы сұйылтуы.

Диагностикалық сезімталдық пен ерекшелікті зерттеу

А типті аусыл вирусының антиденелерін анықтау үшін реагенттер жиынтығының сезімталдығы мен ерекшелігін бағалау мақсатында әртүрлі жануарлардың 994 сарысуын (ІҚМ-564, ҰМ-246, шошқа-184) иммуноферменттік талдау әдісімен зерттеу жүргізілді. Сонымен қатар, әзірленген тестті Қазақстан нарығында ИФТ-ның коммерциялық жиынтығымен салыстырмалы бағалау жүргізілді.

- ИФТ әдісімен А типті аусыл вирусына антиденелерін анықтауға арналған реагенттер жинағы («MVA Group F3ӨӨ» ЖШС, Қазақстан Республикасы)

- VDPPro® FMDV ELISA - А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтауға арналған жинақ, («MEDIAN Diagnostics, Inc.», Корея Республикасы).

- Priocheck® FMDV-ірі қара, қой, ешкі және шошқа сарысуындағы аусыл вирусына қарсы in vitro А типті антиденелерді анықтауға арналған ИФТ, «Prionics AG», Швейцария).

Барлық сынақтар өндірушінің нұсқауларына сәйкес жүргізілді.

Нәтижелері

А типті аусыл вирусына антиденелердің болуына 564 ІҚМ сарысуын зерттеу кезінде «MVA Group F3ӨӨ» ЖШС әзірлеген жиынтықтың сезімталдығы мен ерекшелігі 1-2 кестелерде келтірілген.

1-кесте – А типті аусыл вирусына антиденелердің болуына ІҚМ сарысуларын зерттеу кезінде «MVA Group F3ӨӨ» ЖШС жиынтығының сезімталдығы мен ерекшелігі

Жиынтық	Нәтижелер	Сезімталдық	Ерекшелігі	Барлығы
«MVA Group F3ӨӨ» ЖШС	оң	399	118	517
	теріс	44	3	47
	Барлығы:	443	121	564

2-кесте – ІҚМ сарысуларын зерттеу кезіндегі оң нәтижелердің пайызы

Жиынтық	Оң	Процент
«MEDIAN Diagnostics, Inc.»	404/443	91,19%
«MVA Group F3ӨӨ» ЖШС	399/443	90,06%
«Prionics AG»	387/443	87,35%

ІҚМ қан сарысуындағы А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде ұсынылатын жиынтықтың сезімталдығы 90.06% (399/443) құрады.

ІҚМ қан сарысуындағы А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде жиынтықтың ерекшелігі 97.5% (118/121) құрады.

А типті аусыл вирусына антиденелердің бар-жоғына 246 ҰМ сарысуын зерттеу кезінде «MVA Group F3ӨӨ» ЖШС әзірлеген жиынтықтың сезімталдығы мен ерекшелігі 3-4 кестелерде келтірілген.

3-кесте – А типті аусыл вирусына антиденелердің болуына ҰМ сарысуларын зерттеу кезінде «MVA Group F3ӨӨ» ЖШС жиынтығының сезімталдығы мен ерекшелігі

Жиынтық	Нәтижелер	Сезімталдық	Ерекшелігі	Барлығы
«MVA Group F3ӨӨ» ЖШС	оң	110	119	229
	теріс	13	4	17
	Барлығы:	123	123	246

4-кесте – ҰМ сарысуын зерттеудегі оң нәтижелердің пайызы

Жиынтық	Оң	Процент
«MEDIAN Diagnostics, Inc.»	107/123	86,99%
«MVA Group F3ӨО» ЖШС	110/123	88,4%
«Prionics AG»	105/123	85,36%

Ұсақ малдың қан сарысуындағы А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде ұсынылатын жиынтықтың сезімталдығы 88,4% (110/123) құрады.

Ұсақ малдың қан сарысуындағы А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде жиынтықтың ерекшелігі 96,7 % (119/123) құрады.

А типті аусыл вирусына антиденелердің болуына арналған 184 шошқа сарысуын зерттеу кезінде «MVA Group F3ӨО» ЖШС әзірлеген жиынтықтың сезімталдығы мен ерекшелігі 6-7 кестелерде келтірілген.

5-кесте – Шошқа сарысуының 184 үлгісіндегі «MVA Group F3ӨО» ЖШС жиынтығының сезімталдығы мен ерекшелігі

Жиынтық	Нәтижелер	Сезімталдық	Ерекшелігі	Барлығы
«MVA Group F3ӨО» ЖШС	оң	83	89	172
	теріс	9	3	12
	Барлығы:	92	92	184

6-кесте - Шошқа сарысуын зерттеудегі оң нәтижелердің пайызы

Жиынтық	Оң	Процент
«MEDIAN Diagnostics, Inc.»	81/92	88,04%
«MVA Group F3ӨО» ЖШС	83/92	90,2%
«Prionics AG»	87/92	94,56%

Шошқалардың қан сарысуындағы А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде ұсынылатын жиынтықтың сезімталдығы 90,2% (83/92) құрады.

Шошқалардың қан сарысуындағы А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде жиынтықтың ерекшелігі 96,7 % (89/92) құрады.

Қорытынды

2022 жылы алынған зерттеу нәтижелері келесі тұжырымдарды жасауға мүмкіндік береді:

E. coli EN2566/pET/VP1-а бактериялық штаммы алынды, олар А типті аусыл вирусының VP1 құрылымдық ақуызын білдіреді. Рекомбинантты А ақуызының ерекшелігі батыс блоттинг әдісімен расталған. Рекомбинантты вирустық ақуыздарды экспрессиялаудың және тазартудың оңтайлы шарттары анықталды, бұл препараттарды кем дегенде 95% тазалық дәрежесімен алуға мүмкіндік береді.

Жанама ИФТ-да қолдануға жарамды А типті сарысулар алынды.

А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау үшін жанама ИФТ қоюдың оңтайлы шарттары пысықталды.

А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде тест-жүйенің сезімталдығы ІҚМ қан сарысуындағы 90.06% (399/443), шошқалардың қан сарысуында 90.2% (83/92) және ұсақ малдың қан сарысуында 88.4% (110/123) құрады.

А типті аусыл вирусына антиденелерді анықтау кезінде жиынтықтың ерекшелігі ІҚМ қан сарысуларында 97.5% (118/121), шошқалардың қан сарысуларында 96,7 % (89/92) және ұсақ малдың қан сарысуларында 96,7 % (119/123) құрады.

Осылайша, А типті аусыл вирусына антиденелерін анықтауға арналған ұсынылған ИФТ жинағының сезімталдығы мен ерекшелігін басқа коммерциялық ИФТ жинақтарымен салыстырғанда зерттеу жиынтық ірі қара мал, ұсақ мал және шошқа үлгілерінде айтарлықтай жоғары сезімталдық пен спецификаға ие екенін көрсетті.

Әдебиеттер:

- 1 Hedger R.S., (1981). Foot-and-mouth disease. In *Infectious Diseases of Wild Animals*, 2nd edn, pp. 87-96. Edited by Davis J.W., Karstad L.H. & Trainer D.O., Ames, IA: Iowa State University Press
- 2 Jamal S.M., Belsham G.J., Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res* 44, 116 (2013). (<https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-116>)
- 3 Knowles N.J, Samuel A.R. 2003. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 91:65–80., Samuel A.R. and Knowles N.J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *Journal of General Virology* (2001), 82, 609–621. (doi: 10.1016/s0168-1702(02)00260-5.)
- 4 Clavijo A., Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. Clavijo A. Wright P., Kitching P. *Vet.J.*, 2004, V.167, p.9-22 ([https://doi.org/10.1016/s1090-0233\(03\)00087-x](https://doi.org/10.1016/s1090-0233(03)00087-x))
- 5 Орынбаев М.Б., Закарья К.Д., Хайруллин Б.М., Керимбаев А.А., Омарова З.Д., Копеев С.К., Строчков В.М., Султанкулова К. Молекулярная эпидемиология ящура в Республике Казахстан в 2011-2013гг. *Биотехнология и биобезопасность* №6 2021г с. 19-30 (<https://journal.biosafety.kz/jour/issue/viewIssue/6/5>)
- 6 FAO World Reference Laboratory for FMD Genotyping Report. Report on FMDV O in Kazakhstan in 2022 (<https://www.wrlfmd.org/country-reports/country-reports-2022>)
- 7 Мукантаев К.Н., Шустов А.В., Сыдыкнәби Ы., Инербай Б., Бегалиева А., Муканов К.К. Иммуноферментный анализ на основе рекомбинантного VP1 антигена для серологической диагностики ящура. *Биотехнология. Теория и практика*. 2014, №2, стр. 36-41
- 8 Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem*, 1976, Vol. 72, № 1-2, p. 248-254 (<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>)

IRSTI: 34.27.19

Zh.A. ORYNBAYEVA^{1*}, Z.B. TUNGUSHBAEVA¹, N.B. MOLDAGULOVA²,
E. NAGYZBEKKYZY², N.V. RUDAKOV³

¹Kazakh National Pedagogical University named after Abai, Almaty, Kazakhstan

²Ecostandart.kz, Astana, Kazakhstan

³Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russian Federation

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

COMPARATIVE ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA TO VARIOUS ANTIBIOTICS AND MICROORGANISMS

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.13

Abstract

The main purpose of the study is to identify active strains by screening lactic acid bacteria that have a positive effect on internal hollow organs damaged by alcoholic beverages.

The probiotic product contains active isolates. They are active individually or as part of a consortium. The object of scientific research was mare's milk, koumiss, shubat, yogurt, kefir. During the research, 16 pure cultures of lactic acid bacteria were isolated from lactic acid products. Their antibiotic resistance and antimicrobial activity have been studied.

The study revealed 8 isolates with high probiotic activity. Active isolates were identified using the MALDI-TOF Biotyper Bruker mass spectrometer and it was found that they belong to the following *Lactobacillus*: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*.

Active strains (*Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) were selected to create the necessary consortium for probiotic product used to repair internal hollow organs damaged by alcoholic beverages.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, screening, antimicrobial activity, antibiotic resistance.

The production of probiotic products, aimed at reducing the risk of harm to human health by genetically modified organisms - widely prevalent in our country as food additives - poses a pressing challenge to biological sciences.

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations and WHO's 2001 definition, probiotics are living microorganisms that have a positive effect on human health when present in appropriate quantities in the human body [1]. To obtain a probiotic product with positive effect on human health, the primary step involves identifying active bacteria from lactic acid bacteria. Through scientific study and the determination of useful properties, the aim is to produce a specific product. Consequently, obtaining active strains, determining the antibiotic resistance and antimicrobial activity of lactic acid bacteria. Simultaneously, an urgent challenge lies in addressing the correction of hollow internal organs damaged by alcoholic beverages in the human body through probiotic products.

Many strains of lactic acid bacteria used in the food industry are probiotics that have a stimulating and regulatory effect on the body, having antagonistic properties against pathogenic microorganisms of the gastrointestinal tract. These include *Lactobacillus*, a family of lactic acid bacteria that do not form mainly gram-positive anaerobic spores [2]. Lactic acid bacteria are microorganisms of industrial importance that are used in various forms. They, as a rule, are found in dairy products, plants and the mucous membrane of the intestines of humans and animals, and lactic acid bacteria with the ability to colonize different habitats are metabolically Universal [3, 4]. *Lactobacilli* are one of the series of probiotics that are considered biological therapeutic and immunomodulatory biological drugs recognized as safe. According to recent studies, lactobacilli have shown several antimicrobial mechanisms, such as, for example, the competition of nutrients, the production of inhibitory compounds, immunostimulation and competition for binding sites. In

addition, lactobacilli can produce lactic acid, acetic acid, formic acid and other acids to lower the intestinal pH, which may be the most important mechanism [5]. Most lactic acid bacteria, regardless of their origin, possess the ability to inhibit the growth of pathogens, including problematic, antibiotic-resistant strains, due to their ability to produce metabolites against multiple microbes. Numerous researchers have substantiated the inhibitory activity of various probiotic strains against infectious pathogens [6]. The description of new promising strains of probiotics is a complex process. The functionality and safety of tested lactic acid bacteria are very important. Bacteria must be able to survive in the conditions of processing, storage and digestion of food. Acid and bile resistance are necessary to deliver it to the small intestine, where it can have its positive effects [7].

The study of probiotics provides grounds to assume the presence of various positive properties. However, it appears that the antibacterial activity of probiotic lactobacilli is strain-specific [8,9].

Products containing lactobacilli dominate the global probiotic market; from many sources, they are widely used in biotechnology and food preservation, and are also studied as a healing agent [10]. Strains of lactic acid bacteria *L.acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei* and *L. rhamnosus* was previously described as *Proteus* (*P.mirabilis* and *P.vulgaris*) can be used effectively against urinary tract infections caused by species, that is, to restore the condition of the kidneys [11]. The main direction of scientific research is to determine the antimicrobial activity of lactic acid bacteria, which have probiotic properties, the main goal of the work is [12,13].

According to the research work of scientists, due to the production of general organic acids (milk, vinegar, propionic acid), many strains of lactic acid bacteria can show pronounced antimicrobial activity against various pathogenic microorganisms [14].

Materials and methods of research

Separation of pure cultures

The objects of scientific research were lactic acid products of Almaty and Astana, that is, Mare's milk, kumys, shubat, katyk, kefir. The study revealed a total of 25 different bacteria isolated, including 16 lactic acid bacteria. The study of 16 separated lactic acid bacteria used liquid and solid media of the Mrs. nutrient medium from HiMedia (M369-500g *Lactobacillus* MRS Broth). First, lactic acid bacteria were tested for purity. The purity of the separated cultures was assessed by microscopic observation (E5 Premiere), which made it possible to color according to the Gram method and distinguish bacteria by the biochemical properties of the cell wall. That is, the extracted cultures were incubated for 48 hours on a thermostat at a temperature of 37°C (redLINE RI-53, Germany) in microaerophilic conditions.

The production and consumption of lactic acid products are steadily expanding. However, the assortment predominantly comprises fermented products made from cow's milk. Surprisingly, a nutritional matrix such as mare's milk, which boasts numerous beneficial properties, remains largely untapped. Mare's milk is distinguished by its high nutritional and biological value, coupled with maximum digestibility [14].

The methods used for the purpose of this research work are based on international standards (ISO 8261, milk and dairy products. General guidelines for the preparation of samples, primary suspensions and decimal dilutions for microbiological research) are in accordance with [15].

To determine the resistance of lactic acid bacteria to conditionally pathogenic or pathogenic bacteria of protective properties, a method for determining antimicrobial activity and methods for determining antibiotic resistance were carried out.

Method for determining antimicrobial activity

In the course of the study, determining the antimicrobial activity of lactic acid bacteria, it was determined how resistant or active the studied microorganisms are to pathogenic microorganisms. In general, the research work primarily required the Mrs.-5 culture medium. For the preparation of the Mrs.-5 nutrient medium, hydrolyzed milk was prepared using the Bogdanov method. Next, 43.5 g of milk powder was taken and boiled over a hot fire, pouring up to 500 ml

of distilled water. Then the milk was cooled to 45 C, and the PH – acidity of the milk was brought to the norm of 7.6-7.8. If said figure is lower than 10% NaOH mixture is added and brought to the desired figure. Then 0.5 Pancreatin and 2.5 ml of chloroform were added to the milk and placed in a thermostat at a temperature of +45°C for 72 hours, covering the surface of the flask with a cotton swab and foil. After 72 hours, the milk was boiled for 10 minutes with the face open and then passed through a filter paper through a strainer. Thus, hydrolyzed milk according to the Bogdanov method was sent for sterilization in an autoclave named Tyumen Medico VK-75-01 (0.5 ATM, 20 minutes).

Further, the nutrient medium was prepared with the addition of liver extract, yeast extract, peptone, glucose, twin 80, L-cysteine, $k_2hpo_4 \times 3h_2o$, $MgSO_4 \times 7h_2o$, $MnSO_4$, Agar to the nutrient medium Mrs.-5. After these works were carried out, the solid culture medium Mrs.-5 was prepared and poured into petri dishes.

In this culture medium, test strains of the pathogen *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* were applied to test cultures of *Lactobacillus casei*. The main principle of using this method was found to be visual vision and detection of bacteria. First, a liquid culture medium Mrs.-1 was prepared in a volume of 5 ml, and in a sterile state, pathogen test-Shams were vaccinated in test tubes. The grafted test strains were placed on the thermostat at a temperature of +37°C for 72 hours. Further, the test strains were grafted according to the Drigalsky method by spreading Mrs.-5 on the surface of the culture medium by rubbing it with a spatula. Inoculation of strains into a nutrient medium was carried out by repeated repeated three times without burning the spatula.

In addition, this antimicrobial activity method was implemented using the standard titer application. The titer of bacterial suspensions was performed by visually comparing them with the standard titer, depending on the degree of turbidity. The turbidity standard is considered equal if the clarity of its elements, which are relatively visible through a test tube with a bacterial suspension under study with a standard sample, is the same. If not matched, then the concentration of the analyzed sample is changed until it matches the standard sample. That is, the concentration of microbes depends on the conditions of their growth.

In determining total antimicrobial activity, the following types are used, known according to McFarland turbidity standards: HiMedia R 092 R1 NO (set: R092A (standard 0.5 units) -1 r092b tube (Standard 1 unit) – 1r092c tube (Standard 2 units) – 1 r092d tube (Standard 3 units) - 1 r092e tube (Standard 4 units). However, in our research work (1 R092E tube), a standard equal to 4 units was used. MacFarland's turbidity standards are a set of tubes in which the concentration of barium sulfate increases, that is, we mean that the turbidity of the suspension formed by the white precipitate of barium sulfate corresponds to a certain concentration of bacterial suspension.

For the study of antagonistic activity by diffusion in Agar, a daily suspension of lactic acid bacterial cells 2l3c3 (according to the standard of bacterial turbidity) was prepared in the amount of 1ml/1ml and applied to the surface of the culture medium in a petri dish. Next, the cuttings with a diameter of 10 mm were cut and filled them with cultures of test strains (0.1 ml) [16].

The cultures obtained in the study were introduced into the solid nutrient medium Mrs.-5 in a petri dish and placed in a thermostat at a temperature of +37°C for 24-72 hours. A day later, the diameter of the area that inhibits the growth of bacteria was measured.

Antimicrobial activity was evaluated by inhibition of the growth zone of test cultures that grew around a colony of studied lactic acid bacteria. Indicators of the level of growth of antimicrobial activity are considered high (15-20 mm), medium (10-15 mm), low (10 mm). As a result of the research work, resistance to pathogenic test strains was determined, which are shown below.

The method of determining antibiotic sensitivity is a special modern laboratory method, which is carried out in order to determine the sensitivity of microorganisms taken for research to various antibiotic groups.

In general, two primary methods for determining the sensitivity of microorganisms to antibiotics are known: the first is conducted through diffusion, and the second involves

determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the titration method. The diffusion method relies on the drug's diffusion of a drug (absorbed in a paper disk in various concentrations) into a culture medium, inhibiting the growth of the studied culture spread on the surface of a dense culture medium, while the second is recognized as the most accurate method. In the process of using this method, all the studied cultures were brought to dilution by titration of antibiotic liquid.

So, the sensitivity of pure cultures selected for research to antibiotics was assessed for resistance to 10 different antibiotics using standard discs, following the "guidelines for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs" (MUK 4.2.1890-04 Moscow, 2004). In particular, standard paper discs with bilateral antibiotic absorption: tetracycline (30 mcg), gentamicin (10 mcg), ofloxacin (5 mcg), cefazolin (30 mcg), amikacin (10 mcg), cefamandol (30 mcg), ampicillin (10 mcg), cefotaxime (30 mcg), imipenem (10 mcg), aztreonam (30 mcg) was used. Standard discs were made with dry Bio-RAD product discs, stored at a temperature of +2°C to +6°C.

In further studies, according to the disc-diffusion method, we prepared a suspension with a density of 10 units from pure cultures in an agaric medium, then the resulting suspension was diluted 20 more times and introduced into the surface of the agaric Mrs.-5 culture medium in a petri dish in the form of 1 ml of microbial suspension, then evenly distributed using a spatula, and the excess was removed with a pipette. Then the petri dishes were dried in laminar boxes for 10-15 minutes, and the antibiotic-soaked discs were introduced into the surface of the culture medium in a sterile manner in the amount of no more than 5-6 pieces per petri dish. Further, it was placed on a thermostat at a temperature of +37°C for 24 hours, as a result of which the ability of the studied cultures to be sensitive to the antibiotic was determined. To achieve it, the antibiotic sensitivity of the cultures taken for the study was determined by observing the growth area of microbes in the periphery of the diameter of the disc. When determining the sensitivity of cultures to antibiotics, they were divided into three groups according to the established indicators: hypersensitivity (over 25 mm), medium sensitivity (15-25 mm) and low sensitivity (10-15 mm).

Results and discussion

In a total study, 25 different bacteria were isolated and it was found that 9 species were yeasts and the other 16 species were bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* (Figure 1). Since the main goal of the study was to identify active cultures from lactic acid bacteria, only 16 lactic acid bacteria were taken for the study. Further, methods of antimicrobial activity and antibiotic sensitivity were carried out on the bacteria taken in this study.

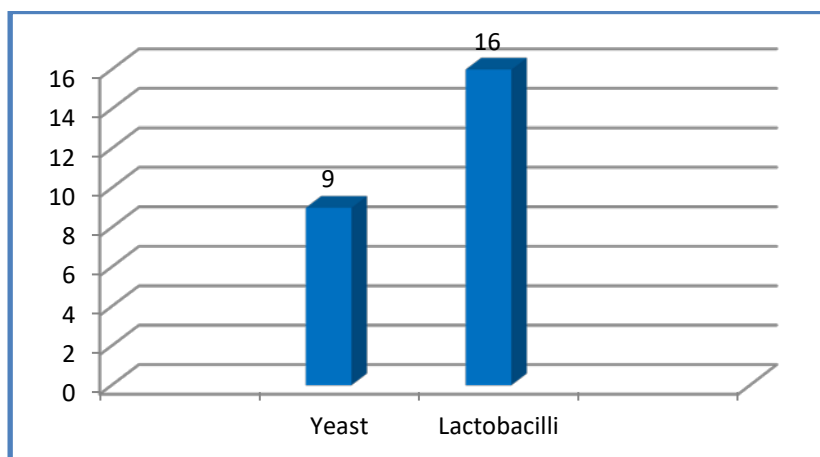


Figure 1-common isolated bacteria

1. Indicators of the level of growth of antimicrobial activity were set as high (15-20 mm), medium (10-15 mm), low (10 mm). According to the results of the study, out of 16 bacteria studied, cultures S-612, s-106, s-414, S-811, S-1, S-2, d-3, d-4 showed a high indicator of resistance to test

strains of pathogens in terms of diameter size (15-20 mm), while other cultures did not show high activity (Figure 2).

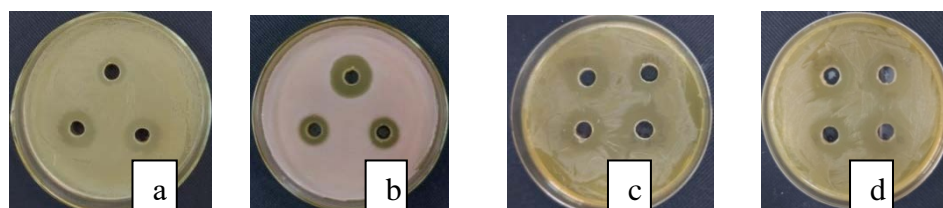


Figure 2-antimicrobial activity of cultures

(a - *Escherichia coli* S-1, S-2, d-3; b - *Serratia marcescens* S-1, S-2, d-3; c - *Salmonella typhimurium* S-1, S-2, d-3, d-4; d - *Staphylococcus aureus* S-1, S-2, d-3, d-4)

Isolates that showed high activity were sent for cryosave, and as a result of the determination of antimicrobial activity, the highest activity of these cultures was determined for *Salmonella typhimurium* among common pathogenic bacteria, as shown in Table 1. This means that the activity of lactobacilli on pathogenic microorganisms gave the intensity of growth in the indicator of a diameter of up to 20 mm, that is, showed a positive result of scientific work.

Table 1-Test-inhibition diameter zone (mm) showing antimicrobial activity of lactic acid bacteria on strains

№	Isolated	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> S-612	12	16	10	12
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-106	9	10	10	8
3	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> S-149	-	10	10	10
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-74	-	10	20	10
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-414	10	12	20	10
6	<i>Lactobacillus salivarius</i> S-21	-	10	5	-
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	9	18	20	11
8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S-819	-	-	20	-
9	<i>Lactobacillus curvatus</i> II-1-5	-	-	-	-
10	<i>Lactobacillus reuteri</i> S-805	10	-	-	-
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	10	14	7	12
12	<i>Lactobacillus brevis</i> S -2	11	14	11	9
13	<i>Lactobacillus reuteri</i> S -4	-	7	7	11
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> d- 2	5	10	9	13
15	<i>Lactobacillus casei</i> d-3	14	13	11	11
16	<i>Lactobacillus fermentum</i> d-4	6	13	10	12

Note: activity indicators: 15-20 mm –high; 10-15 mm - medium; 10 mm-low

2. Determination of antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria is presented in Table 2. The 16 bacteria in the study had varying degrees of antibiotic sensitivity. In the course of the method for determining antibiotic sensitivity to lactic acid bacteria, strains that showed high results showed the following indicators: s-106/26.5 mm to tetracycline; s-1/26 mm; S-811/28.5 mm to cefazoline; s-414/28.5 mm; d-4/26 mm; s-612/25.5 mm to imipenem; s -2/27 mm to ampicillin.

Table 2-antibiotic sensitivity of strains

№	Izolated	tetracycline, mm	gentamicin, mm	ofloxacin, mm	cefazolin, mm	amikacin, mm	cefotaxime, mm	imipenem, mm	aztreonam, mm	cefamandol, mm	ampicillin, mm
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> S-612	25	15	10	25	10	18	25,5	5	11	25
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-106	26,5	20	7	28	15	9	25	10	8	25,5
3	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> S-149	3	2	10	13	3	10	7	7	12	7
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-74	5	0,1	0,5	3	5	0,2	2	5	7	10
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-414	16	15	15	28,5	25	20	26	12	15	25
6	<i>Lactobacillus salivarius</i> S-21	2	5	10	13	5	10	10	10	5	7
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	10	15	16	28,5	20	18	26,5	15	15	25,5
8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S-819	10	5	7	15	15	8	5	5	5	3
9	<i>Lactobacillus curvatus</i> П-1-5	4	5	5	2	4	10	10	7	10	10
10	<i>Lactobacillus reuteri</i> S-805	5	10	8	15	7	15	16	5	8	10
11	<i>Lactobacillus acidophylus</i> S-1	26	20	14	25	18	15	25	18	11	25
12	<i>Lactobacillus brevis</i> S -2	25	5	10	10	20	15	19	20	5	27
13	<i>Lactobacillus reuteri</i> S -4	20	15	8	15	10	25	18	10	5	15
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> d- 2	10	5	5	4	10	5	5	7	8	10
15	<i>Lactobacillus casei</i> d-3	10	15	15	25	15	20	15	10	15	25,5
16	<i>Lactobacillus fermentum</i> d-4	10	18	15	25,5	20	25	23	10	15	26

In the research work, when performing an experiment on active strains using the method of determining antibiotic sensitivity, their sensitivity to ten different antibiotics to varying degrees in terms of growth intensity was determined. As a result, the bacteria showed high (25 mm) sensitivity to tetracycline, imipenem, ampicillin and cefazolin, and medium (15-25 mm) sensitivity to cefataxin, amikacin, gentamicin and low (10-15 mm) sensitivity properties to ofloxacin, aztreonam, cefamandol.

The pure and active cultures selected in the study were identified by the Bruker MALDI-TOF biotype system using classical microbiological methods, and the following names of strains belonging to the genus *Lactobacillus* were known: *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophylus* s-1, *Lactobacillus brevis* s-2, *Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus fermentum* d-4.

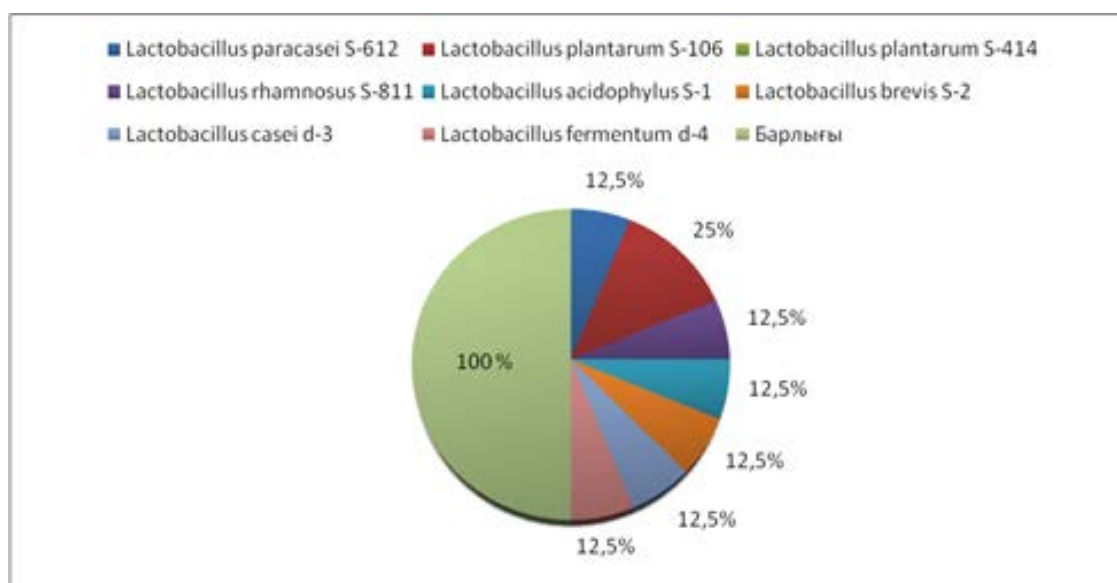


Figure 3-active strains

The diagram shows the percentages of 8 active strains. Among the 8 strains, *Lactobacillus plantarum* s - 106, *Lactobacillus plantarum* s-414 showed an indicator of 25%. The remaining strains were *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus rhamnosus* s-811, *Lactobacillus acidophilus* s-1, *Lactobacillus brevis* s-2, *Lactobacillus casei* d-3 and *Lactobacillus fermentum* d-4, each of which accounted for 12.5%.

Conclusion

Many ongoing scientific studies in the field of biology aim at obtaining probiotic products, several of which find applications in treating the intestinal tract in the fields of medicine and pharmaceuticals. Notably, the scientific work distinguishes itself from other studies in that the prospective and most active probiotic consortium is made up of a set of alcoholic beverages that focus on correcting the internal organ cavity organs damaged by fermented probiotic Bran, including enhancements to kidney and liver function.

The research yielded 8 active strains with antimicrobial activity and 7 active strains with high antibiotic sensitivity from lactic acid bacteria using methods for determining antimicrobial activity and antibiotic sensitivity. As a result of the study, out of 16 lactobacilli obtained, S-612, s-106, s-414, s-811, s-1, S-2, d-3, D-4 strains with antimicrobial activity were identified, and S-612, s-106, s - 414, s-811, s-1, s-2, d-4 strains were found to exhibit a high degree of antibiotic sensitivity.

A consortium of selected strains of *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* s-106, *Lactobacillus plantarum* s-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* s-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus fermentum* d-4 a probiotic fermented product was created. Currently, clinical trials of the obtained probiotic product on rats in the experimental biological clinic "vivarium" named after A. atshabarov, research and auxiliary structural unit of the medical university named after S. zh.Asfendiyarov, Almaty, continue. That is, a histological study of the effect of a probiotic product on the hollow organs of the internal organs of rats damaged by alcoholic beverages is being carried out. This clinic is part of the Research Institute of fundamental medicine.

References:

1. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1—4 October 2001.
2. Nadirova S.A., Sinyavskiy Yu.A., Lessova Zh.T., Alibayeva B.N. The effect of probiotic starter culture on the fermentation process of yogurt. *Mikrobiologiya zhane virusologiya*, № 1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.10)
3. Yerlikaya O., Saygili D., Akpinar A. Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Sci. Technol* (Campinas) №41 (2) 2021 (doi.org/10.1590/fst.03920)
4. Xiaojing W., Yan Zh, Hong Zh, Fengwei T. Antimicrobial activities and in vitro properties of cold-adapted *Lactobacillus* strains isolated from the intestinal tract of cold water fishes of high latitude water areas in Xinjiang. Wei et al. *BMC Microbiology* 2019 (doi.org/10.1186/s12866-019-1623-3)
5. Chi-Chung Ch., Chih-Cheng Lai., Hui-Ling H. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Front. Microbiol.*, Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy. Volume 10 - 2019 (doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789)
6. Jinal Bhola and Rama Bhadekar. In vitro synergistic activity of lactic acid bacteria against multi-drug resistant staphylococci. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2019. (doi.org/10.1186/s12906-019-2470-3)
7. Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Shaikhin S., Almagambetov K., Abzhalelov A., Saduakhassova S. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods. *Asian Journal of Applied Sciences* Year: 2016 | Volume: 9 | Issue: 4 | Page No: 143-158 (doi: 10.3923/ajaps.2016.143.158)

8. Massirbaeva A.D., Saifudin A.S., Amirasheva B.K., Zhantlessova S.D. Clinical use of probiotics and prebiotics. *Mikrobiologiya zhāne virusologiya*, № 1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.04)
9. Eid R., El Jakee., Rashidy A., Asfour H., Omara S. Potential Antimicrobial Activities of Probiotic Lactobacillus Strains Isolated from Raw Milk. *J Prob Health* 2016 (doi.org/10.4172/2329-8901.1000138)
10. Sun Zh., Hugh M., Harris B., Angela Mc. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun* 2015 Sep 29;6:8322. (doi:10.1038/ncomms9322)
11. Halder D, Mandal M., Chatterjee Sh., Mandal Sh. Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* 2017, 5, 31. (doi:10.3390/biomedicines5020031)
12. Evivie SE., Li B., Ding X., Meng Y., Yu S., Du J., Xu M., Li W., Jin D., Huo G., Liu F. *Front Microbiol.* T. 8. (doi: 10.3389/fmicb.2017. № 01. – P. 238)
13. Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Boyko N., Cresci A. *J. Appl. Microbiol.* № 2. 2014 (doi:10.1111/jam.12544. P. 518–527)
14. Abdulzhanova M.A., Kistaubayeva A.S., Ignatova L.V. Poluchenie jogurta na osnove suhogo kobylego moloka, obogashennogo probioticheskimi mikroapsulami. *Mikrobiologiya zhāne virusologiya*, № 2 (41) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.06)
15. Orynbayeva Zh.A., Tungushbayeva Z.B., Moldagulova N.B., Kulzhanova D.K. Adgeziya ədisimen perspektivti probiotikalық shtammdardy alu. *Mikrobiologiya zhāne virusologiya*, №3 (42) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14)
16. Abitayeva G.K., Sarmurzina Z.S., Bissenova G.N., Mussabayeva B.K.. Harakteristika shtammov probiotikov dlya razrabotki napitkov profilakticheskogo naznacheniya. *Mikrobiologiya zhāne virusologiya*, №4 (39) 2022 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)

Ж.А. ОРЫНБАЕВА^{1*}, З.Б. ТУНГУШБАЕВА¹, Н.Б. МОЛДАГУЛОВА²,
Э. НАГЫЗБЕККЫЗЫ², Н.В. РУДАКОВ³

¹Казахский национальный педагогический университет им.Абая, Алматы, Казахстан

²Экостандарт.kz, Астана, Казахстан

³Омский НИИ природно-очаговых инфекций, Омск, Российская Федерация

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ К РАЗЛИЧНЫМ АНТИБИОТИКАМ И МИКРООРГАНИЗМАМ

Аннотация

Основная цель исследования — выявить активные штаммы путем скрининга молочнокислых бактерий, оказывающих положительное влияние на внутренние полые органы, поврежденные алкогольными напитками.

Пробиотический продукт содержит активные изоляты. Они проявляют свою активность индивидуально или в составе консорциума. Объектами проведенных научных исследований являлись кобылье молоко, кумыс, шубат, простокваша, кефир. В ходе исследований из молочнокислых продуктов были выделены 16 чистых культур молочнокислых бактерий. Изучена их антибиотикорезистентность и антимикробная активность.

В результате исследований выявлено 8 изолятов с высокой пробиотической активностью. Активные изоляты были идентифицированы с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF Biotyper Bruker и установлено, что они принадлежат к следующим видам *Lactobacillus*: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*.

Активные штаммы (*Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) были выбраны с целью создания необходимого консорциума для пробиотического продукта, используемого для восстановления внутренних полых органов, поврежденных алкогольными напитками.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пробиотики, скрининг, антимикробная активность, устойчивость к антибиотикам.

FTAMP:34.27.19

Ж.А. ОРЫНБАЕВА^{1*}, З.Б. ТҰҢҒЫШБАЕВА¹, Н.Б. МОЛДАГУЛОВА²,
Э. НАҒЫЗБЕКҚЫЗЫ², Н.В. РУДАКОВ³

¹Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

²Экостандарт.kz, Астана, Қазақстан

³Омбы табиғи – ошақты инфекциялар ҒЗИ, Омбы, Ресей Федерациясы

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

СҮТҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ӘРТҮРЛІ АНТИБИОТИКТЕР МЕН МИКРООРГАНИЗМДЕРГЕ САЛЫСТЫРМАЛЫ БЕЛСЕНДІЛІКТЕРІ

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.13

Түйін

Зерттеудің негізгі мақсаты – алкогольдік сусындармен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелеріне оң әсер ететін сүтқышқылды бактерияларға скрининг жүргізу арқылы белсенді штамдарды анықтау.

Пробиотикалық өнімнің құрамдас бөлігі - белсенді изоляттар. Олар жеке дара немесе консорциум құрамында белсенділік танытады. Жүргізілген ғылыми зерттеу жұмыстың нысаны ретінде бие сүті, қымыз, шұбат, қатық, айран өнімдері алынды. Зерттеу барысында сүтқышқылды өнімдерден 16 сүтқышқылды бактериялардың таза культуралары бөлініп алынды. Олардың антибиотикке төзімділіктері мен антимикробтық белсенділіктері зерттелді.

Зерттеу нәтижесінде жоғары пробиотикалық белсенділікке ие 8 изолят анықталды. Белсенді изоляттар MALDI-TOF Biotyper Bruker масс-спектрометр көмегімен идентификацияланып, олардың *Lactobacillus* туыстығына жататын келесі түрлері екендігі белгілі болды: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*.

Белсенді штамдар (*Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) алкогольді сусынмен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелерін қалпына келтіру үшін қолданатын пробиотикалық өнімге қажетті консорциум құру мақсатында таңдалып алынды.

Кілтгі сөздер: сүтқышқылды бактериялар, пробиотиктер, скрининг, антимикробтық белсенділік, антибиотикке төзімділік.

Қазіргі кезде елімізде тағамдарға қоспа ретінде кең таралған гендік модификацияланған организмдер өнімдерінің адам денсаулығына зиян келтіру қауіпін азайту мақсатында пробиотикалық өнімдерді шығару биология ғылымдарының алдына қойылған өзекті мәселелердің бірі болып табылады.

2001 жылы Біріккен Ұлттар Ұйымы мен ДДҰ-ның Азық-түлік және ауыл шаруашылығы ұйымының ұсынылған анықтамасына сәйкес, пробиотиктер - тірі микроорганизмдер және олар адам организміне тиісті мөлшерде болған кезде адам денсаулығына оң әсер ететіндігі туралы толық айтылған [1]. Ғылыми зерттеу жұмысы адам денсаулығына жағымды әсер беретін пробиотикалық өнім алу үшін ең алдымен сүтқышқылды бактериялардан белсенді бактерияларды анықтау қажет және де оны ғылыми тұрғыдан зерттеп, пайдалы қасиеттерін анықтау арқылы оны белгілі бір өнім шығаруға бағытталады. Осыған орай, сүтқышқылды бактериялардың антибиотикке төзімділігі мен антимикробтық белсенділіктерін анықтай отырып, белсенді штамдарды алу маңызды. Сонымен қатар, қазіргі таңда адам ағзасындағы алкогольді сусындармен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелерін пробиотикалық өнімдер арқылы түзеу өзекті мәселе болып табылады.

Тамақ өнеркәсібінде қолданылатын сүт қышқылды бактериялардың көптеген штамдары асқазан-ішек жолдарының патогенді микроорганизмдеріне қарсы антагонистік қасиеттері бар организмге ынталандырушы және реттеуші әсер ететін пробиотиктер болып

табылады. Оларға негізінен грам-позитивті анаэробты спора түзбейтін сүт қышқылды бактериялардың тұқымдасы *Lactobacillus* жатады [2]. Сүт қышқылды бактериялар - әртүрлі нысандарда қолданылатын өнеркәсіптік маңызы бар микроорганизмдер. Олар, әдетте сүт өнімдерінде, өсімдіктерде және адам мен жануарлардың ішектерінің шырышты қабығында кездеседі және әр түрлі тіршілік ету ортасын колонизациялау қабілеті бар сүт қышқылды бактериялар метаболикалық әмбебап болып табылады [3, 4]. Лактобактериялар-бұл қауіпсіз деп танылған биологиялық терапевтік және иммуномодуляциялық биологиялық препараттар болып саналатын пробиотиктер қатарының бірі. Жақында жүргізілген зерттеулер бойынша лактобактериялар бірнеше микробқа қарсы механизмдерін көрсетті, мысалы айтатын болсақ, қоректік заттардың бәсекелестігі, ингибиторлық қосылыстардың өндірісі, иммуностимуляция және байланысатын орындар үшін бәсекелестік. Сонымен қатар, лактобактериялар ішектің рН деңгейін төмендету үшін сүт қышқылын, сірке қышқылын, құмырсқа қышқылын және басқа қышқылдарды шығара алады, бұл ең маңызды механизм болып табылуы мүмкін [5]. Сүт қышқылды бактерияларының көпшілігі шығу тегіне қарамастан, олардың бірнеше микробтарға қарсы метаболиттерді өндіру қабілетіне байланысты патогендердің, соның ішінде проблемалы, антибиотикке төзімді штаммдардың өсуін тежеу мүмкіндігіне ие. Көптеген зерттеушілер осындай жұқпалы қоздырғыштарға қатысты әртүрлі пробиотикалық штамдардың ингибиторлық белсенділігін дәлелдеді [6]. Пробиотиктердің жаңа перспективалы штаммдарының сипаттамасы - бұл күрделі процесс. Тексерілген сүтқышқылды бактериялардың функционалдығы мен қауіпсіздігі өте маңызды болып табылады. Бактериялар тағамды өңдеу, сақтау және қорыту жағдайында өмір сүре алуы керек. Қышқыл мен өт төзімділігі оны аш ішекке жеткізу үшін қажет, онда ол өзінің оң әсерін тигізуі мүмкін [7].

Пробиотиктерді зерттеу олардың көптеген жағымды қасиеттерінің болуын болжауға негіз береді. Алайда пробиотикалық лактобактериялардың бактерияға қарсы белсенділігі штаммға тән болып көрінеді [8,9].

Құрамында лактобактериялар бар өнімдер пробиотиктердің әлемдік нарығында басым; көптеген көздерден олар биотехнологияда және тағамды сақтауда кеңінен қолданылады, сонымен қатар емдік агент ретінде зерттеледі [10]. Сүт қышқылды бактериялардың штамдары *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei* және *L. rhamnosus* бұрын көрсетілгендей *Proteus* (*P. mirabilis* және *P. vulgaris*) түрлерін тудыратын зәр шығару жолдарының инфекцияларына қарсы, яғни бүйректің жағдайын қалпына келтіруде тиімді қолданылуы мүмкін [11]. Ғылыми зерттеудің негізгі бағыты пробиотикалық қасиетке ие сүтқышқылды бактериялардың микробқа қарсы белсенділігін анықтау жұмыстың негізгі мақсаты болып табылады [12,13].

Ғалымдардың зерттеу жұмыстарына сүйенсек, жалпы органикалық қышқылдар (сүт, сірке суы, пропион қышқылы) өндірісінің арқасында сүтқышқылды бактериялардың көптеген штаммдары түрлі патогенді микроорганизмдерге қарсы айқын антимикробтық белсенділік көрсете алады [14].

Зерттеу материалы және әдістері

Таза культураларды бөліп алу

Ғылыми зерттеу жұмысына нысан ретінде Алматы және Астана қалаларының үй жағдайындағы сүтқышқылды өнімдері яғни, бие сүті, қымыз, шұбат, қатық, айран алынды. Зерттеу барысында жалпы бөлініп алынған 25 түрлі бактериялар, оның ішінде 16 сүтқышқылды бактериялар белгілі болды. Бөлінген 16 сүтқышқылды бактерияларды зерттеуге HiMedia фирмасының (M369-500G *Lactobacillus* MRS Broth) MPC қоректік ортасының сұйық және қатты ортасы қолданылды. Алдымен сүтқышқылды бактериялар тазалыққа тексерілді. Бөлінген культуралардың тазалығы Грамм әдісі бойынша боялып, бактериялардың жасуша қабырғасының биохимиялық қасиеттері бойынша ажыратуға мүмкіндік беретін микроскопиялық бақылау (E5 Premiere) арқылы бағаланды. Яғни, бөліп

алынған культураларды микроаэрофильді жағдайда 37°C температурадағы (redLINE RI-53, Германия) термостатқа 48 сағатқа инкубацияға қойылды.

Сүтқышқылды өнімдерді өндіру және тұтыну тұрақты түрде кеңейіп келеді. Алайда, олардың асортименті негізінен сиыр сүтінен жасалған ашытылған өнімдерден тұрады. Көптеген пайдалы қасиеттері бар бие сүті сияқты тағамдық матрица іс жүзінде қолданылмайды. Бірақ, ол жоғары тағамдық және биологиялық құндылыққа, сондай-ақ максималды сіңімділікке ие [14].

Осы зерттеу жұмысының мақсатында қолданылатын әдістер халықаралық стандарттарға (ISO 8261, Сүт және сүт өнімдері. Микробиологиялық зерттеулер үшін сынамаларды, бастапқы суспензияларды және ондық сұйылтуларды дайындау бойынша жалпы нұсқаулар) сәйкес болып табылады [15].

Сүтқышқылды бактериялардың шартты патогенді немесе патогенді бактерияларға қорғаныш қасиеттерінің төзімдігін анықтау үшін антимиқробтық белсенділікке анықтау әдісі және де антибиотикке төзімділігін анықтау әдістері жүргізілді.

Антимиқробтық белсенділікті анықтау әдісі

Зерттеу барысында сүтқышқылды бактериялардың антимиқробтық белсенділігін анықтай отырып, зерттелетін микроорганизмдердің патогенді микроорганизмдерге қаншалықты төзімді немесе оларға қарсы белсенді екені анықталды. Жалпы зерттеу жұмысына ең алдымен МРС-5 қоректік ортасы қажет болды. МРС-5 қоректік ортасын дайындау үшін Богданов әдісін қолдану арқылы гидролизденген сүт дайындалды. Әрі қарай 43,5 г құрғақ сүт алынып, үстіне 500 мл ге дейін дистилденген су құйып ыстық отта қайнатылды. Одан соң сүт 45°C дейін суытып, сүттің рН – қышқылдығы 7,6-7,8 нормасына дейін жеткізілді. Егер аталған көрсеткіш төмен болса 10% NaOH қоспасы қосылып, қажетті көрсеткішке жеткізілді. Одан соң сүтке 0,5 панкреатин және 2,5 мл хлороформ қосып араластырылып, колбаның бетін мақталы пробкамен және фольгамен жауып 45°C температурадағы термостатқа 72 сағатқа қойылды. 72 сағат өткен соң сүтті 10 минут беті ашық күйде қайнатып, әрі қарай фильтр қағазынан сүзгіштен өткізілді. Осылайша Богданов әдісі бойынша гидролизденген сүт Тюмень Медико ВК-75-01 атты автоклавқа (0,5 атм, 20 минут) зарарсыздануға жіберілді.

Одан әрі МРС-5 қоректік ортасына бауыр сығындысы, ашытқы сығындысы, пептон, глюкоза, твин 80, L-цистеин, $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4$, агар қоректік ортасы қосылып қоректі орта дайындалды. Осы жұмыстар жүргізілген соң, МРС-5 қатты қоректік ортасы дайындалып Петри табақшаларына құйылды.

Аталған қоректік ортаға *Lactobacillus casei*-дің сынақ ретінде алынған культураларына *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* патогенді тест-штаммдар қолданылды. Бұл әдісті қолданудағы негізгі принципі бактерияларды визуалды көру және анықтау болып табылды. Алдымен 5 мл көлемде МРС-1 сұйық қоректік ортасы дайындалып, зарарсыздандырылған күйде патогенді тест-штаммдар пробиркаларға егілді. Егілген тест-штаммдар 37°C температурасында термостатқа 72 сағатқа қойылды. Әрі қарай, тест-штаммдар Дригальский әдісі бойынша МРС-5 қоректік орта бетіне шпательмен ысқылау арқылы таратылып егілді. Штаммдарды қоректік ортаға егу шпательді күйдірмей үш рет қайталау арқылы жүргізілді.

Сонымен қатар, бұл антимиқробтық белсенділік әдісі стандартты титр қолдану көмегімен іске асырылды. Бактериялық суспензиялардың титрын бұлдырлық дәрежесіне байланысты визуалды түрде стандарт титрмен салыстыру арқылы жүргізілді. Стандартты үлгімен зерттелетін бактериялық суспензиясы бар пробирка арқылы салыстырмалы түрде көрінетін элементтерінің айқындылығы бірдей болған жағдайда, бұлдырлық стандарт тең деп есептеледі. Егер сәйкес келмесе, онда талданатын үлгінің концентрациясы стандартты үлгіге сәйкес келгенше өзгертіледі. Яғни, микробтардың концентрациясы олардың өсу жағдайларына байланысты болып табылады.

Жалпы антимиқробтық белсенділікті анықтауда Макфарландтың бұлдырлану стандарттары бойынша келесідей белгілі түрлері қолданылады: HiMedia R 092 R1 NO

(жиынтықта: R092A (стандарт 0,5 бірлік) -1 R092B түтігі (стандарт 1 бірлік) – 1R092C түтігі (стандарт 2 бірлік) – 1 R092D түтігі (стандарт 3 бірлік) - 1 R092E түтігі (стандарт 4 бірлік). Дегенмен, біздің зерттеу жұмысымызда (1 R092E түтігі) 4 бірлікке тең стандарты қолданылды. Макфарландтың бұлдырлану стандарттары дегеніміз барий сульфатының концентрациясы жоғарылай түсетін түтіктер жиынтығы, яғни барий сульфатының ақ преципитатынан түзілген суспензияның бұлдырлануы бактериялық суспензияның белгілі бір концентрациясына сәйкес келуін айтамыз.

Агардағы диффузия әдісімен антагонистік белсенділікті зерттеуге 213с3 сүтқышқылды бактерия жасушаларының тәуліктік суспензиясы (бактериялық бұлдырлану стандартына сәйкес) 1мл/1мл мөлшерінде дайындалып және қоректік ортаның бетіне Петри табақшасына жағылды. Әрі қарай, диаметрі 10 мм болатын саңлаулар кесіліп, оларды тест-штамдарының культураларымен толтырылды (0,1 мл) [16].

Зерттеуге алынған культуралар Петри табақшасындағы МРС-5 қатты қоректік ортасына жасалған саңлауға енгізіліп +37°C температурада термостатқа 24-72 сағатқа қойылды. Бір күннен кейін бактериялардың өсуін тежейтін аймақтың диаметрі өлшенді.

Антимикробтық белсенділік зерттелген сүтқышқылды бактериялардың колониясы айналасында өскен сынақ культураларының өсу аймағының тежелуі бойынша бағаланды. Антимикробтық белсенділіктің өсу деңгейінің көрсеткіштері жоғары (15-20 мм), орташа (10-15 мм), төмен (10 мм) болып қарастырылады. Зерттеу жұмысының нәтижесінде патогенді тест-штамдарға төзімділіктер анықталды, олар төменде көрсетілген.

Антибиотикке сезімталдылығын анықтау әдісі – зерттеуге алынған микроорганизмдердің түрлі антибиотик топтарына сезімталдығын анықтау мақсатында жүргізілетін арнайы заманауи зертханалық әдіс.

Жалпы микроорганизмдердің антибиотиктерге сезімталдығын анықтаудың екі негізгі әдісі белгілі: біріншісі диффузиялық, екіншісі титрлеу әдісі арқылы минималды ингибиторлық концентрациясын (МИК) анықтау көмегімен жүргізіледі. Диффузиялық әдіс препараттың (қағаз дискіге түрлі концентрацияда сіңірілген) қоректік орта диффузиясына және тығыз қоректік ортаның бетіне себілген зерттелетін культураның өсуін тежеуге негізделген болса, ал екіншісі ең нақты әдіс деп танылған. Бұл әдісті қолдану барысында барлық зерттелетін культуралар антибиотик сұйықтығын титрлеу арқылы сұйылтуға дейін жеткізілді.

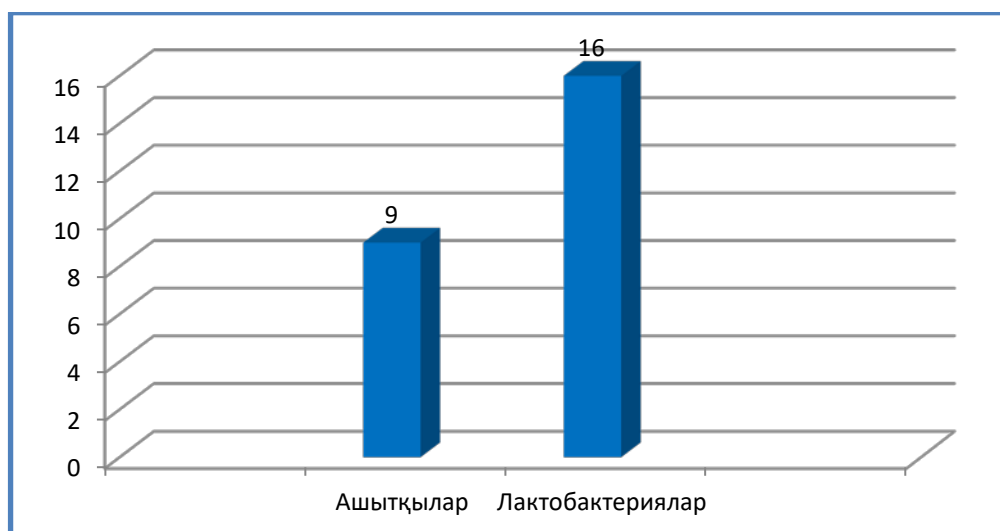
Сонымен, зерттеуге алынған таза культуралардың антибиотиктерге сезімталдығы "Микроорганизмдердің антибактериалды препараттарға сезімталдығын анықтау бойынша әдістемелік нұсқауларға" сәйкес стандартты дискілерді қолдану арқылы (МУК 4.2.1890-04 Мәскеу, 2004) 10 түрлі антибиотикке төзімділігі тексерілді. Нақты айтсақ екі жақты антибиотик сіңірілген стандартты қағаз дискілер: тетрациклин (30 мкг), гентамицин (10 мкг), офлоксацин (5 мкг), цефазолин (30 мкг), амикацин (10 мкг), цефамандол (30 мкг), ампициллин (10 мкг), цефотаксим (30 мкг), имипенем (10 мкг), азтреонам (30 мкг) көлемінде қолданылды. Стандартты дискілер +2°C пен +6°C градус температурасында сақталатын құрғақ BIO-RAD компаниясының өнімінің дискілерімен жүргізілді.

Бұдан ары зерттеуде, диск-диффуздық әдіске сай агарлы ортадағы таза культуралардан тығыздығы 10 бірлік болатын суспензия дайындап алдық, содан соң алынған суспензия тағы 20 рет сұйылтылып Петри табақшасындағы агарлы МРС-5 қоректік ортасының бетіне 1 мл микробтық суспензия түрінде енгізіліп, кейін ол шпатель көмегімен біркелкі таратылып, артық мөлшері тамшуырмен алып тасталды. Одан соң, Петри табақшалары ламинарлы бокста 10-15 минут кептіріліп, антибиотик сіңірілген дискілерді бір Петри табақшасына 5-6 данадан артық емес мөлшерде қоректік ортаның бетіне зарарсыздандырылған түрде енгізілді. Әрі қарай, +37°C температурадағы термостатқа 24 сағатқа қойылып, нәтижесінде зерттеліп отырған культуралардың антибиотикке сезімталдылық қабілеті анықталды. Оған жету үшін дискінің диаметрі перифериясында микробтардың өсу ареалын бақылап отырып, зерттеуге алынған культуралардың антибиотикке сезімталдығы анықталды. Культуралардың антибиотикке сезімталдылығын

анықтау барысында, белгіленген көрсеткіштермен, яғни жоғары сезімтал (25 мм-ден жоғары), орташа сезімтал (15-25 мм) және төмен сезімтал (10-15 мм) көрсеткіштері ретінде үш топқа бөліп қарастырылды.

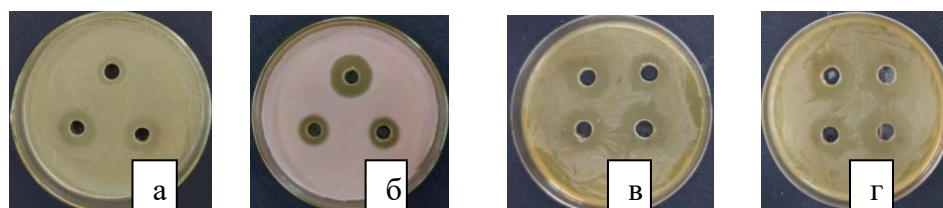
Нәтижелер және оларды талқылау

Жалпы зерттеу барысында 25 түрлі бактериялар бөлініп, олардың 9 түрі ашытқылар, ал қалған 16 түрі *Lactobacillus* туыстығына жататын бактериялар екенін анықталды (сурет 1). Зерттеудің негізгі мақсаты сүтқышқылды бактериялардан белсенді культураларды анықтау болғандықтан, зерттеуге 16 сүтқышқылды бактериялар ғана алынды. Әрі қарай, осы зерттеуге алынған бактерияларға антимикробтық белсенділік пен антибиотикке сезімталдылық әдістері жүргізілді.



Сурет 1– Жалпы бөлініп алынған бактериялар

1. Антимикробтық белсенділіктің өсу деңгейінің көрсеткіштері жоғары (15-20 мм), орташа (10-15 мм), төмен (10 мм) болып белгіленді. Зерттеудің нәтижесі бойынша зерттеуге алынған 16 бактериялардың ішінен S-612, S-106, S-414, S-811, S-1, S-2, d-3, d-4 культуралары патогенді тест-штамдарына төзімділікті көрсету бойынша диаметр өлшемі жағынан жоғары көрсеткішті көрсетті (15-20 мм), ал қалған культураларда жоғары белсенділік байқалмады (сурет 2).



Сурет 2 –Культуралардың антимикробтық белсенділіктері
(а - *Escherichia coli* S-1, S-2, d-3; б - *Serratia marcescens* S-1, S-2, d-3; в - *Salmonella typhimurium* S-1, S-2, d-3, d-4; г - *Staphylococcus aureus* S-1, S-2, d-3, d-4)

Жоғары белсенділік көрсеткен изоляттар криосақтауға жіберіліп, антимикробтық белсенділікті анықтау нәтижесінде 1 кестеде көрсетілгендей жалпы патогенді бактериялардың ішінде *Salmonella typhimurium*-ға аталған культуралардың ең жоғары белсенділігі анықталды. Бұл дегеніміз, патогенді микроорганизмдерге

лактобактериялардың белсенділігі 20 мм-ге дейін диаметр көрсеткіште өсу қарқындылығын берді, яғни ғылыми жұмыстың оң нәтижелілігін көрсетті.

Кесте 1 – тест-штамдарға сүтқышқылды бактериялардың антимикробтық белсенділіктерін көрсететін ингибирлеу диаметр зонасы (мм)

№	Isolated	<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> S-612	12	16	10	12
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-106	9	10	10	8
3	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> S-149	-	10	10	10
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-74	-	10	20	10
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-414	10	12	20	10
6	<i>Lactobacillus salivarius</i> S-21	-	10	5	-
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	9	18	20	11
8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S-819	-	-	20	-
9	<i>Lactobacillus curvatus</i> П-1-5	-	-	-	-
10	<i>Lactobacillus reuteri</i> S-805	10	-	-	-
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	10	14	7	12
12	<i>Lactobacillus brevis</i> S -2	11	14	11	9
13	<i>Lactobacillus reuteri</i> S -4	-	7	7	11
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> d- 2	5	10	9	13
15	<i>Lactobacillus casei</i> d-3	14	13	11	11
16	<i>Lactobacillus fermentum</i> d-4	6	13	10	12

Ескерту: Белсенділік көрсеткіштері: 15-20 мм –жоғары; 10-15 мм- орташа; 10 мм –төмен;

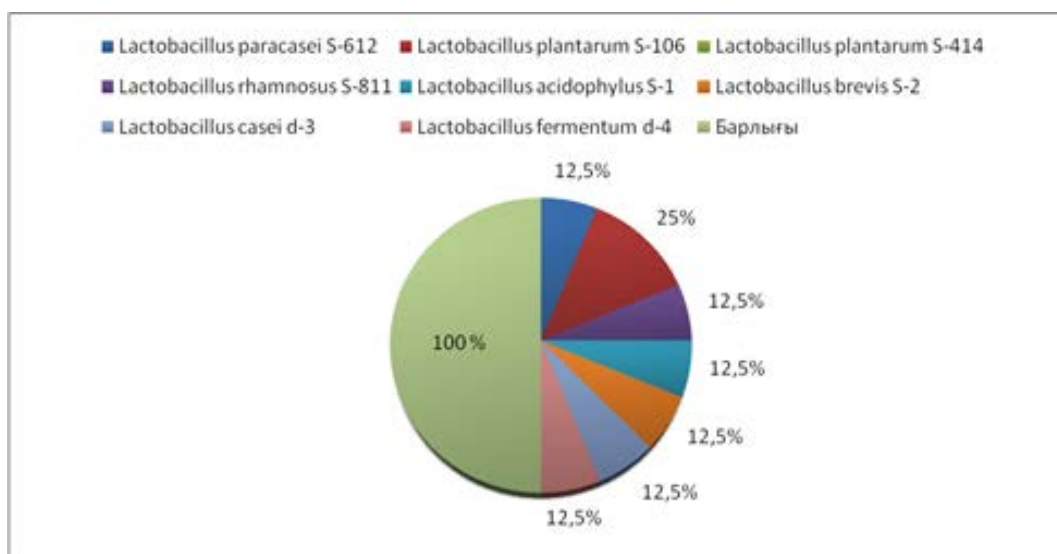
2. Сүтқышқылды бактериялардың антибиотикке сезімталдылығын анықтау 2 кестеде ұсынылған. Зерттеуге алынған 16 бактериялардың антибиотикке сезімталдылық көрсеткіші әртүрлі дәрежеде болды. Сүтқышқылды бактерияларға жүргізілген антибиотикке сезімталдылығын анықтау әдісі барысында жоғары нәтиже көрсеткен штамдардың келесідей көрсеткіш көрсетті: тетрациклинге S-106/26,5 мм; S-1/26 мм; цефазолинге S-811/28,5 мм; S-414/28,5 мм; d-4/26 мм; имипенемге S-612/25,5 мм; ампициллинге S -2/27 мм көрсеткіштерін көрсетті.

Кесте 2 - Штамдардың антибиотиктерге сезімталдылығы

№	Культуралар	Антибиотиктерге сезімталдылық (мм)									
		тетрациклин	гентамицин	офлоксацин	цефазолин	амикацин	цефотаксим	имипенем	азтреонам	цефамандол	ампициллин
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> S-612	25	15	10	25	10	18	25,5	5	11	25
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-106	26,5	20	7	28	15	9	25	10	8	25,5
3	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> S-149	3	2	10	13	3	10	7	7	12	7
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-74	5	0,1	0,5	3	5	0,2	2	5	7	10
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-414	16	15	15	28,5	25	20	26	12	15	25
6	<i>Lactobacillus salivarius</i> S-21	2	5	10	13	5	10	10	10	5	7
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	10	15	16	28,5	20	18	26,5	15	15	25,5
8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> S-819	10	5	7	15	15	8	5	5	5	3
9	<i>Lactobacillus curvatus</i> П-1-5	4	5	5	2	4	10	10	7	10	10
10	<i>Lactobacillus reuteri</i> S-805	5	10	8	15	7	15	16	5	8	10
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	26	20	14	25	18	15	25	18	11	25
12	<i>Lactobacillus brevis</i> S -2	25	5	10	10	20	15	19	20	5	27
13	<i>Lactobacillus reuteri</i> S -4	20	15	8	15	10	25	18	10	5	15
14	<i>Lactobacillus fermentum</i> d- 2	10	5	5	4	10	5	5	7	8	10
15	<i>Lactobacillus casei</i> d-3	10	15	15	25	15	20	15	10	15	25,5
16	<i>Lactobacillus fermentum</i> d-4	10	18	15	25,5	20	25	23	10	15	26

Зерттеу жұмысында, антибиотикке сезімталдылықты анықтау әдісін қолдану арқылы белсенді штамдарға эксперимент жүргізгенде олардың он түрлі антибиотиктерде өсу қарқындылығы бойынша әртүрлі дәрежеде сезімталдығы анықталды. Нәтижесінде бактериялар тетрациклинге, имипенемге, ампициллинге және цефазолинге жоғары (25 мм) сезімталдығын, ал цефатаксинге, амикацин, гентамицинге орташа (15-25 мм) сезімталдылығын және офлоксацинге, азтреонамға, цефамандолға төмен (10-15 мм) сезімталдылық қасиеттерін көрсетті.

Зерттеу барысында таңдалған таза және де белсенді культуралар классикалық микробиологиялық әдістерді қолдану арқылы Bruker MALDI-TOF BIOTYPER жүйесі арқылы идентификациядан өтіп, *Lactobacillus* туыстығына жататын келесі штамдар атаулары белгілі болды: *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophylus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus fermentum* d-4.



Сурет 3 – Белсенді штамдар

Диаграммада 8 белсенді штамдардың пайыздық көрсеткіштері берілген. 8 штамдардың ішінде *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414 штамдары 25% көрсеткішті көрсетті. Ал қалған штамдар *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophylus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus fermentum* d-4 штамдардың әрқайсысы 12,5%-дан құрады.

Қорытынды

Қазіргі кезде биология саласында жүргізіліп жатқан көптеген ғылыми зерттеулерде пробиотикалық өнімдер алынады, олардың көпшілігі медицина саласы мен фармацевтика саласында ішек жолдарын емдеуге пайдаланылады. Алайда, жүргізілген ғылыми жұмыстың басқа зерттеулерден ерекшелігі перспективті және ең белсенді пробиотикалық консорциум жиынтығынан құралған алкогольді сусындармен зақымданған ішкі ағза қуыс мүшелерін ферменттелген пробиотикалық кебек арқылы түзетуде, соның ішінде бүйрек пен бауырдың жұмысын жақсартуға бағытталады.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде антимикробтық белсенділік пен антибиотикалық сезімталдылықты анықтайтын әдістерді пайдалана отырып сүтқышқылды бактериялардан антимикробтық белсенділікке ие 8 белсенді штамдар және антибиотикке сезімталдылығы жоғары 7 белсенді штамдар алынды. Зерттеу қорытындысы бойынша алынған 16 лактобактериялардың ішінен антимикробтық белсенділікке ие S-612, S-106, S-414, S-811,

S-1, S-2, d-3, d-4 штамдар анықталды, ал антибиотикке сезімталдығы бойынша жоғары дәрежені көрсеткен S-612, S-106, S-414, S-811, S-1, S-2, d-4 штамдары анықталды.

Таңдалған *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus casei* d-3, *Lactobacillus fermentum* d-4 штамдарынан консорциум жиынтығы құрылып, пробиотикалық ферменттелген өнім жасалды. Қазіргі таңда алынған пробиотикалық өнім Алматы қаласы, С.Ж. Асфендияров атындағы медицина университетінің ғылыми-көмекші құрылымдық бөлімшесі А.Атшабаров атындағы «Виварий» эксперименттік-биологиялық клиникасында егеуқұйрықтарға клиникалық сынақ жұмыстары жалғасуда. Яғни, алкогольді сусындармен зақымдалған егеуқұйрықтардың ішкі ағза қуыс мүшелеріне пробиотикалық өнімнің әсерін гистологиялық зерттеу жұмыстары жүргізілуде. Аталған клиника іргелі медицина ғылыми-зерттеу институтының құрамына кіреді.

Әдебиеттер:

1 Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria // Cordoba, Argentina, 1 - 4 October 2001.

2 Nadirova S.A., Sinyavskiy Yu.A., Lessova Zh.T., Alibayeva B.N. The effect of probiotic starter culture on the fermentation process of yogurt. *Микробиология және вирусология*, № 1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.10)

3. Yerlikaya O., Saygili D., Akpinar A. Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Sci. Technol (Campinas)* №41 (2) 2021 (doi.org/10.1590/fst.03920)

4. Xiaojing W., Yan Zh, Hong Zh, Fengwei T. Antimicrobial activities and in vitro properties of cold-adapted *Lactobacillus* strains isolated from the intestinal tract of coldwater fishes of high latitude water areas in Xinjiang. *Wei et al. BMC Microbiology* 2019 (doi.org/10.1186/s12866-019-1623-3)

5. Chi-Chung Ch., Chih-Cheng Lai., Hui-Ling H. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Front. Microbiol.*, Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy. Volume 10 - 2019 (doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789)

6. Jinal Bholia and Rama Bhadekar. In vitro synergistic activity of lactic acid bacteria against multi-drug resistant staphylococci. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2019. (doi.org/10.1186/s12906-019-2470-3)

7. Nagyzbekkyzy E., Abitayeva G., Anuarbekova S., Shaikhina D., Shaikhin S., Almagambetov K., Abzhalelov A., Saduakhassova S. Investigation of acid and bile tolerance, antimicrobial activity and antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from Kazakh dairy foods. *Asian Journal of Applied Sciences Year: 2016 | Volume: 9 | Issue: 4 | Page No: 143-158* (doi: 10.3923/ajaps.2016.143.158)

8. Massirbaeva A.D., Saifudin A.S., Amirasheva B.K., Zhantlessova S.D. Clinical use of probiotics and prebiotics. *Микробиология және вирусология*, № 1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.04)

9. Eid R., El Jakee., Rashidy A., Asfour H., Omara S. Potential Antimicrobial Activities of Probiotic *Lactobacillus* Strains Isolated from Raw Milk. *J Prob Health* 2016 (doi.org/10.4172/2329-8901.1000138)

10. Sun Zh., Hugh M., Harris B., Angela Mc. Expanding the biotechnology potential of *Lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun* 2015 Sep 29;6:8322 (doi:10.1038/ncomms9322)

11. Halder D, Mandal M., Chatterjee Sh., Mandal Sh. Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* 2017, 5, 31. (doi:10.3390/biomedicines5020031)

12. Evvie SE., Li B., Ding X., Meng Y., Yu S., Du J., Xu M., Li W., Jin D., Huo G., Liu F. *Front Microbiol.* T. 8. (doi: 10.3389/fmicb.2017. № 01. – P. 238)

13. Coman M.M., Verdenelli M.C., Cecchini C., Silvi S., Orpianesi C., Boyko N., Cresci A. *J Appl. Microbiol.* № 2. 2014 (doi:10.1111/jam.12544. P. 518–527)

14 Абдулжанова М.А., Кистаубаева А.С., Игнатова Л.В. Получение йогурта на основе сухого кобыльего молока, обогащенного пробиотическими микрокапсулами. *Микробиология және вирусология*, № 2 (41) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.02.06)

15 Орынбаева Ж.А., Тұңғышбаева З.Б., Молдагулова Н.Б., Құлжанова Д.Қ., Рудаков Н.В. Адгезия әдісімен перспективті пробиотикалық штаммдарды алу. *Микробиология және вирусология*, №3 (42) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14)

16 Абиатаева Г., Сармурзина З., Бисенова Г., Мусабаева Б., Тултабаева Т. Характеристика штаммов пробиотиков для разработки напитков профилактического назначения. *Микробиология және вирусология*, №4 (39) 2022 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)

IRSTI: 68.37.29

N.N. SALYBEKOVA^{1*}, A.K. APUSHEV¹, B.Yu. YUSUPOV¹, G. KAHRAMAN²,
B.B. TOYZHIGITOVA¹, A.Sh. MAMBAEVA³

¹Khoja Akhmet Yassawi International Kazakh-Turkish University, Turkistan, Kazakhstan

²Erciyes University, Kayseri, Turkey

³Eurasian Technological University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: nurdana.salybekova@ayu.edu.kz

PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *PENICILLIUM SP.* ON TULIPS

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.14

Abstract

Plant disease is a very complex pathological process. Phytopathogenic fungi occupy the main place among pathogenic microorganisms in plants. One of them is the causative agent of fungal disease – penicilliosis. The purpose of the work is to determine the distribution and species composition of fungi of the genus *Penicillium sp.* The bioecological features of the causative agent of the disease affecting tulips grown in open and greenhouse conditions have been revealed. In related tulip species, surface infection prevailed over subepidermal infection. These types of fungi had a significant impact on the quality of the bulb, significantly reducing the germination and viability of the affected. The most affected exclusive variety was the type of Tulipa Dynasty and the most stable-Tulipa Delta Storm.

The spread and development of the disease (P%) were determined by the wet chamber method, cultivation of *Penicillium sp* on PDA (potato-dextrose agar), microscopic analysis, as well as PCR (polymerase chain reaction). The results of PCR analysis showed that tulips in greenhouse conditions are mainly affected by the fungi *Talaromyces variabilis (Penicillium variabile)*, the prevalence of penicilliosis averaged about 7-9% in the period from 2021 to 2022.

As a result of the comparison, the type of strain was identified. The relevance of the names of fungi identified as a result of identification, and the correct spelling of the names of species was checked using the nomenclature of the Mycobank information base.

Keywords: tulips, phytopathogenic fungi, penicilliosis, prevalence, PCR test.

Tulips (*Tulipa spp.*) are one of the most common ornamental plants. Of 42 wild species of tulips growing in Kazakhstan, 18 are listed in the Red Book of Kazakhstan. In many countries where tulips are found, this unusual plant is listed in the Red Book as a rare ornamental plant. Numerous studies have proved that mountainous Central Asia, including Kazakhstan, is the main center for the growth of wild tulips [1-4]. The whole world has recognized Kazakhstan as the birthplace of the tulip, but unfortunately, Kazakhstan does not have its varieties, there is no systematic introduction, breeding, and seed-growing work on tulips, the influence of the elements of the technology of distillation and reproduction, concerning the subarid conditions of the south and south-east of Kazakhstan, recommended by suppliers of planting material, is not studied. Only 9 varieties of tulip are allowed to be used in the territories of the Republic of Kazakhstan, and after 2009, not a single variety is recommended [5, 6].

In Kazakhstan, many flower growers are engaged in flower distillation, using planting materials and technologies of the Netherlands, Turkey, and other countries. In the landscaping of populated areas of Kazakhstan, varieties that have not received admission to the territories of the Republic of Kazakhstan are used.

Flowering plants belonging to the lily group as a whole play an important role in the landscaping of settlements, among which tulips are increasingly used for landscaping purposes. Due to their high adaptability, they are grown in various climatic zones, and used for decorative purposes to create flower beds due to the peculiarities of spring flowering [7, 8]. An urgent problem that needs to be solved along with the correct application of their cultivation technologies

is the implementation of protective measures to prevent a complex of diseases to achieve the goals [9].

Fungi of the genus *Penicillium sp.*, belonging to the class *Ascomycetes*, order *Eurotiaceae*, family *Trichocomaceae*, cause penicilliosis in various bulbous crops and a number of plants. Diseased species significantly affect the proper growth and maturation of tulip plants. This type of disease harms underground bulbs not only during the storage of bulbs but also during the growing season [10]. One of the most important studies is the precise definition and separation of the pathogenic type of pathogen. Identification of the species is the main stage of all biological research. Correct identification, along with the biological and ecological characteristics of each species, is the beginning of determining the physiological and biochemical composition, as well as the development of measures to combat the disease caused by fungi. Along with the description of morphological features in determining a taxonomic species, one of the important steps is an identification system based on a variety of DNA sequences of fungal species.

Materials and methods of research

The research was carried out in the Botanical Garden of the Khoja Akhmet Yassawi International Kazakh-Turkish University in 2021-2022. The study included 5 varieties of tulips of Dutch selection Albatros, Delta storm, Fun for two, Strong power, Dynasty. The studied varieties belong to the garden class «Triumph».

Clean cultures of fungi species were grown on potato-dextrose agar (PDA) at 27°C. 10 days after the separation into colonies and obtaining biomass for the analysis of 18S rRNA, DNA isolation work was carried out according to the protocol of the CTAB method.

The DNA concentration of 900 ng/μl was measured (OD260) using a spectrophotometer (Nanodrop Thermo ND-1000, Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

During the work, the following methods were used: visual assessment of the prevalence (P%) and the development of the disease, biological efficacy of drugs, and wet chamber methods.

For further use, DNA samples were stored at a temperature of 4°C. Each PCR reaction was carried out in a final volume of 50 μl and consisted of a 10-fold Taq buffer with 5.0 μl CSI (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 2.5 mM MgCl₂ 3.0 μl, 100 mM 8.0 μl dNTP, 1 μl from each primer, 5U/μl Taq-DNA polymerase-recombinant (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) 0.25 μl, 27.8 μl of sterile distilled water and 4 μl of a suspension of the DNA of a fungal organism species (100 ng) used as a sample.

Results and discussion

Surface infection prevails over subepidermal infection of related species, and refers to the type of fungus that develops on the bulbous or seed surface. It has been observed that micromycetes, after preserving the initial material, form populations of saprotrophic species with favorable conditions (Figure 1). These types of fungus have had a significant impact on the quality of the bulb. Reduces the germination and viability of damaged individuals.

As a result of observation of the type of disease, it was found that from 2021 to 2022, the prevalence of penicilliosis in 5 basic varieties in 2022 was 7.2%. The most affected variety is the Dynasty variety (R = 8.9%), and the most resistant is Delta Storm (R = 2.1%).

At +7 °C, the prevalence of the disease was 6.5%, at +10 °C - 9%, a high percentage of the prevalence of penicilliosis is due to a violation of the technological process and sudden temperature changes [11].



Figure 1- Storage of bulbs and corm formation in the early stages of vegetation in the greenhouse

Identification of species belonging to the genus *Penicillium* is a complex process because they differ in their diversity. For a detailed diagnosis of the species composition, we used the PCR analysis. Pure plantings of mushroom species were grown on PDA at 27 °C (Figure 2).

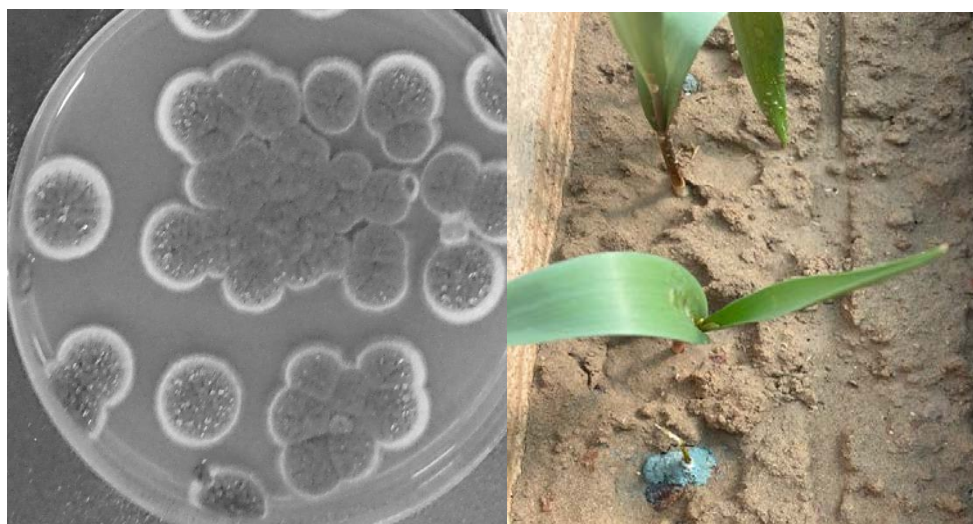


Figure 2- Clean culture of *Penicillium* and damaged bulb

On the 8th day after separation into colonies and obtaining biomass for the analysis of 18S rRNA, DNA isolation work was carried out following the protocol of the CTAB method [12]. A study was conducted on a pure vaccination of the causative agent of penicillois affecting the bulb, that is, for one strain. For phylogenetic analysis, the studied strain was compared with related species of *Penicillium* and other fungal isolates in the GenBank database.

The DNA test according to the PCR amplification program 5.8 primers ITS1 and ITS4 ITS1 - TCCGTAGGTGAACCTGCG and ITS4 - TCCTCCGCTTATTGATATGC were used to create a sequence of RNA coding genes and internal transcription spacers. 3 minutes provide denaturation at a temperature of 95 °C, which is 35 revolutions at 95 °C - 30 seconds, 57 °C - 50 seconds and 72 °C 30 seconds, and the final stage of elongation was carried out for 5 minutes at 72 °C. The PCR program for primers NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG and NL-4 GGTCCGTGTTTTCAAGACGG for amplification of the D1/D2 domain in the 26s rRNA gene provides denaturation at a temperature of 3 minutes 95 °C, which is 35 revolutions at 95 °C -30

seconds, 52 °C -50 seconds and 72 °C- 30 seconds, with the final stage of elongation 72 °C 5 minutes [12-14].

Amplified PCR products (10 µl) and 100 bp of the DNA stage (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) 0.5 x TAE 1 hour 30 minutes are determined in a buffer of 80 v/cm by electrophoresis with 1.5% agarose gel. Ethidium bromide agarose gel (0.5 mcg/ml) was placed for 10 minutes. The gel was photographed using a system of photographing under ultraviolet light [15, 16]. The sequencing of 18S rRNA and 5.8S RNA genes was carried out on the AE 3000 automatic sequencer (Applied Biosystems, USA). The resulting nucleotide sequence uses the BLASTn online service [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast] and was compared with the GenBank information base.

As a result of the comparison, the type of strain was identified. The relevance of the names of fungi identified as a result of identification, and the correct spelling of species names was checked using the nomenclature of the Mycobank information base.

To determine the phylogenetic relationship of similar species, a method was used to compare the nucleotide sequences of the ITS1 and ITS2 regions encoding the 18S rRNA gene and internal transcriptor spacers. The sequences obtained by sequencing the sequence of genes encoding 18S rRNA and the DNA fragment of the ITS1 and ITS2 regions of internal transcriptor spacers are shown in Table 1. Research results and their analysis.

Table 1- The sequence of genes obtained by sequencing a DNA fragment

Encoded gene	The nucleotide sequence
1	2
18S rRNA	GKSGRRGGGAAWCAWAGGTATAAGCACTTTGTACTGTGAAACTGCGAATGGC TCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCCTACTACATGGATACCTGTG GTAATTCTAGAGCTAATACATGCGCAAAACCCCGACTTCGGAAGGGGTGTATT TATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTACATAAACT TAACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTAT CAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGGCAACGGGTAACGGGG AATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAA GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCAATCCCGATCCGGGGAGGTAGTGAC AATAAATACTGATATAGGGCTCTTTTGGGTCTTATAATTGGAATGAGTACAAT CTAATCTCTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCG CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTC GTAGTTGAACCTTGGGCCCGTCCGCGGTCCGCCTCACCGCGAGTACTGGTC CGGATGGGTCTTTCTTTCTGGGGAATCCCATGGCCTTCACTGGCTGTGGCGGG GAACCAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTTTGC TCGGATACATTAGCATGGAATAATAAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTGTG GTTCTAGGACCGCCGYAAYGATTAATARGATAGTCCGGGGCGTCAATATCAG CTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTGCTGAAACTAAYTACTGMCGAAAGCAT TCGCCAAGAKGTTTTTATTATCAGGAAKGAAGTTAGGGGGATTSAAGAAAR GAKCTSGKAATWGCAT
5.8S rRNA	GGGATGGTATCTCGTCTTATTGATATGCGCAGGTTACCTACGGCAAKCMKG GSGGYCTAGAKGGAAGACCAGCGCCSACCGAATCCCTCCCGAGCGGGTGACA GAGCCCCATACGCTCGAGGACCCGACGCGGCCGCCACTGCTTTTGGGGCGT GTCCCCGGGGGGACAGCACCCAACCCAGCCGTGCTGGAGGGCAGAAATGA CGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAA AGATTGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTG CGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAAATGAT TAAAATCTCACTCAGACTCACTGTTTCAGGCAGGGTTCTAGGGTGCTTCGGCG GCGCGGGCCCCGGGGCAGAAGCCCCCGGCGACCGGGGCCAGGCCCCAGTG GGCCCCGCGAGGCAACGCGGTAACAGTAAACACGGGTGGGAGGTTGGGCTCG TTCGAACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCGAGTTACCTACGGAAG

Table 1 continued

1	2
26S rRNA	CCCC GTGGCAACGCCACACSTACTGTGTGTCATCGGCTASAGCTTARATTTGA AATCCGGCTCCTTCGGGGCCCCACTTGKMATTTGGAGAGGATGCTTCGGGCGT GGCCCCTATCTAAGTGCCCTGGARCGGGCCGYCWTAGAGGGTGAGAATCCCG TCTGGGATGGGTGGTCCC GCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTT TGGGAATGCAGCTCTAAGAGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATATTGGC CGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGA AAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCATTGGCAACCA GACTTGCTGGGGGAGGCTCAGCCGGCACGTGTGCCGGTGC ACTCCTCCCCGGC AGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTCCGTCAAAGGCCCTGGGAATGTAGCACCT TCGGGGTGCCTTATAGCCCGGGGTGCCATGCGACCTGCCCGGACCGAGGAAC GCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCGTAATGGTTGTCAATGGCCCCTTGAACA CGGACC

The similarity of the nucleotide sequences of the gene encoding the 18s rDNA strain under study was analyzed by the BLAST server [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>].

Initial screening of the GenBank database showed that the studied strain belongs to the following systematic group: *Eukaryota*; *Fungi*; *Dikarya*; *Ascomycota*; *Pezizomycotina*; *Eurotiomycetidae*; *Eurotiales*; *Trichocomaceae*; *Talaromyces*.

The strains involved in the analysis and the similarity level of the 18S DNA sequences of the studied strain are shown in Table 2.

Table 2- Similarity level of the 18S DNA sequences

Description	Query cover	Ident	Accession
1	2	3	4
Penicillium variable strain DAOM 216318 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	95%	98%	JN938974.1
Penicillium rugulosum strain DAOM 216317 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	95%	98%	JN938973.1
Penicillium sp. 12-02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	EU667999.1
Penicillium phialosporum strain KCTC16070 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245265.1
Penicillium rugulosum strain KCTC16050 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245232.1
Penicillium sp. DspF10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	KT958531.1
Penicillium phialosporum strain KCTC16053 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245235.1
Penicillium tardum strain KCTC16068 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245256.1
Penicillium sp. MF555 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	KM096353.1
Talaromyces rugulosus strain 10.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	KF018457.1
Penicillium variable strain KCTC16056 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	97%	AF245238.1
Penicillium sp. KCTC16061 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245247.1
Penicillium purpurogenum strain KCTC6785 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245246.1

Table 2 continued

1	2	3	4
Penicillium crateriforme strain KCTC6784 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245228.1
Penicillium purpurogenum strain KCTC4777 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245248.1
Penicillium purpurogenum strain KCTC16055 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245237.1
Talaromyces viridis gene for 18S rRNA, strain: CBS 114.72	95%	96%	AB024587.1
Penicillium pinophilum isolate MR-2 18S rDNA partial sequence gene, complete sequence	92%	97%	JN222360.1
Penicillium sp. KCTC16067 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245254.1
Penicillium sp. 26.21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	97%	KF018476.1
Penicillium pinophilum strain KCTC16057 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245239.1
Penicillium sp. DspF9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	98%	KT958530.1

Homology of at least 97% is considered to be the criterion for classifying a microorganism to a particular species [17]. As can be seen from the table, the analyzed strain can be attributed to several species. The method of comparing the nucleotide sequences encoding the 5.8S gene was also used to establish phylogenetic relationships of the closest related species. The sequences obtained by sequencing the sequences of genes encoding 5.8S rRNA and parts of the DNA of the ITS1 and ITS2 regions of internal transcripotor spacers are shown in Table 3 [18,19].

The strains involved in the analysis and the level of similarity of sequences encoding the D1/D2 domain of the 26s rRNA gene of the strain under study are shown in Table 3.

Table 3- Similarity of sequences encoding the D1/D2 domain of the 26s rRNA gene

Description	Query cover	Ident	Accession
1	2	3	4
Penicillium variabile strain KUC1476 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	HM469398.1
Penicillium variabile strain DAOM 216318 28S ribosomal RNA (LSU) gene, partial sequence	94%	97%	JN938936.1
Fungal endophyte isolate ABS-95-R2-b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	95%	KM657064.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0050 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	97%	KF673601.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0028 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	97%	KF673579.1
Penicillium variabile strain NRRL 58760 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	97%	HQ698594.1

Table 3 continued

1	2	3	4
Penicillium variabile strain NRRL 6419 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	96%	HQ288049.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	97%	KF673712.1
Talaromyces rotundus large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	95%	AF285116.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0130 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	97%	KF673664.1
Penicillium sp. NRRL 35203 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	93%	EF634390.1
Penicillium resedanum strain NRRL 578 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	93%	AF033398.1
Penicillium marneffei gene for large subunit rRNA, partial sequence, strain: IFM 41708	94%	90%	AB363755.1
Fungal sp. F260 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	93%	JQ747696.1
Penicillium marneffei gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	94%	90%	AB219804.1
Penicillium sp. HSD07B 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	90%	HM367083.1
Penicillium verruculosum 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	90%	AF510496.1
Rasamsonia sp. CCF 5289 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain CCF 5289	94%	90%	LT548281.1
Penicillium cf. resedanum MU-52 isolate 52 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	93%	EF100952.1
Penicillium oblatum gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: IFO 33091	94%	90%	AB047230.1
Paecilomyces pascuus gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: IFO 33090	94%	90%	AB047229.1

Phylogenetic kinship analysis conducted using strains of closely related microorganisms showed that the closest species to the studied strain is *Talaromyces variabilis* (*Penicillium variabile*).

Results and discussion

The widespread fungal pathogen *Penicillium variable* for many crops, especially when stored together with seed material, leads to a significant loss of seedlings. According to the morphological characteristics and molecular method of the pathogen of the fungus affecting tulips, the type of isolate was determined. Morphological study of colony growth on PDA, the result of color and microscopic analyses required clarification of the species difference. Although when the

bulbs of tulips are damaged, threads are usually formed upon contact with the outer surface, they gradually develop throughout the plant tissue. One can clearly see the complete destruction of the plant organ due to mycotoxins secreted by fungal species.

It is not enough to use only morphological features to identify a species. A molecular method was used to accurately determine the type of fungus. With the help of PCR, the criterion for attributing the pathogen to a particular species was precisely selected. To determine the phylogenetic relationship of similar species, a method was used to compare the nucleotide sequences of 18S rRNA, 5.8S rRNA, 26s rRNA of the coding gene, and internal spacer transcriptors ITS1 and ITS2. Phylogenetic analysis of the relationship showed that the closest species to the studied strain is *Talaromyces variabilis* (*Penicillium variabile*).

Funding

This research is funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant no. AP14870298).

References:

- 1 Stikhareva T., Ivashchenko A., Kirillov V., Rakhimzhanov A. Floristic diversity of threatened woodlands of Kazakhstan formed by populus pruinosa schrenk. In: *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45, V 2. 2021:165 – 178. (DOI:10.3906/tar-2006-70)
- 2 Sharipov A., Puratov U. *Lolalar. Tyul'pany*. Tashkent, Uzbekiston millij enciklopediyasi, 1997, 144.
- 3 AL-Chalabi, Angham Talal Mahmoud. Effect of adding yeast solution and soil mixture on growth and bulbs production traits of tulip (*Tulipa generiana* L.). In: *Indian Journal of Ecology* V. 47, 2020:252–257.
- 4 Khaleghi A.; Khadivi, A., Zonneveld Ben J. M.b. Morphological variations among and within species of wild tulip (*Tulipa* L.) from Iran. In: *Genetic Resources and Crop Evolution*. V.65(8). 2018:2241 – 22661. (DOI: 10.1007/s10722-018-0688-4)
- 5 Ivashchenko A.A. Belyalov O.V. *Kazakhstan-rodina tyul'panov*. Almaty: «Atamura», 2019, 368.
- 6 Vvedenskij I.A. Rod 272. *Tyul'pan Tulipa L. Flora SSSR*. T. 4. L.: Izd-vo AN SSSR, 1935, 760.
- 7 Kashin A.S., Petrova N.A.; Shilova I.V. Some Features of the Environmental Strategy of *Tulipa gesneriana* L. (Liliaceae, Liliopsida). In: *Biology Bulletin*. V 44(10). 2017:1237–12451. (DOI: 10.1134/S1062359017100053).
- 8 Khaleghi A.; Khadivi, A., Zonneveld Ben J. M.b. Morphological variations among and within species of wild tulip (*Tulipa* L.) from Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution*. V 65(8). 2018: 2241 – 22661. (DOI: 10.1007/s10722-018-0688-4).
- 9 Zonneveld B.J.M., J.J. de Groot. *Tulipa kolbintsevii* Zonn. a new species from Eastern Kazakhstan. In: *Plant Syst Evol.*, V. 298. 2012:1293–1296 (DOI: 10.1007/s00606-012-0635-3).
- 10 Ahatov A.K., Dzhililov F.S., Beloshapkina O.O., Strojkov YU.M., CHizhov V.N. *Zashchita rastenij ot boleznej v teplicah: spravochnik*. M.: Tovarishchestvo nauchnyh izdanij KMK, 2002, 464.
- 11 Zajceva E.N., Bylov V.N. *Tekhnologiya vyrashchivaniya lukovic tyul'panov dlya vygonki: metod. ukazaniya*. -M.: Agropromizdat, 2008, 55.
- 12 Wilson B., Dolotbakov A., Burgess B.J., Clubbe C., Lazkov G., Shalpykov K., Ganybaeva M., Sultangaziev O., Samuel F. Central Asian wild tulip conservation requires a regional approach, especially in the face of climate change. In: *Biodiversity and Conservation*, 2021, 30:1705–1730 (doi:org/10.1007/s10531-021-02165-z).
- 13 E. De Clerck, T. Vanhoutte, T. Hebb, J. Geerinck, J. Devos, and P. De Vos. Isolation, Characterization, and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. In: *Applied and Environmental Microbiology*, June 2004:3664-3672.
- 14 Yang, Lu., Liao X., Cheng P., Zhang Zhi-Gang., Li H. Composition and diurnal variation of floral scent emission in *Rosa rugosa* Thunb. and *Tulipa gesneriana* L. In: *Open Chemistry*. V.18(1). 2020:1030-1040. (DOI: 10.1515/chem-2020-0087).
- 15 Horton T.R., Burns T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. In: *Molecular Ecology*. V. 10. 2001:1855-1871.

16 Saubenova M.G., Olejnikova E.A., Ermekbaj ZH.N., Ajtzhanova A.A., Bokenov D.D., Potoroko I.YU. Mikrobiologicheskie aspekty vyrashchivaniya vysshih gribov. *Mikrobiologiya i virusologiya*. V.3(34). (doi:org/10.53729/MV-AS.2021.03.01)

17 Kashin A.S., Petrova N.A.; Shilova I.V. Some Features of the Environmental Strategy of Tulipa gesneriana L. (Liliaceae, Liliopsida). In: *Biology Bulletin*. V.44 (10). 2017:1237 – 12451. (DOI: 10.1134/S1062359017100053)

18 Clerck E.De., Vanhoutte T., Hebb T., Geerinck J., Devos J., Vos P.De. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 2004:3664–3672.

19 Prashant K., Mishra R.T.V., Culham F.A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003:329–332. (DOI: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11537.x)

Н.Н. САЛЫБЕКОВА^{1*}, А.К. АПУШЕВ¹, Б.Ю. ЮСУПОВ¹, Г. КАХРАМАН²,
Б.Б. ТОЙЖИГИТОВА¹, А.Ш. МАМБАЕВА³

¹Қожа Ахмет Ясауи атындағы Халықаралық қазақ-түрік университеті, Түркістан,
Қазақстан

²Эрджиес Университеті, Кайсери, Түркия

³Еуразия технологиялық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: nurdana.salybekova@ayu.edu.kz

ҚЫЗҒАЛДАҚТАРДАҒЫ *PENICILLIUM SP.* ТҰҚЫМДАСЫНЫҢ ФИТОПАТОГЕНДІ САҢЫРАУҚҰЛАҚТАРЫ

Түйін

Өсімдік ауруы, өте күрделі патологиялық үдеріс. Өсімдіктерде ауру тудырушылардың ішінде басты орын алатындар фитопатогенді саңырауқұлақтар. Соның бірі зең ауруы қоздырушысы – пенициллез ауруы. Жұмыстың мақсаты - *Penicillium sp.* тұқымдас саңырауқұлақтардың таралуы мен түрлік құрамын анықтау. Ашық және жылыжай жағдайында өсірілген қызғалдақтарды зақымдаған ауру қоздырушысының биоэкологиялық ерекшеліктері анықталды. Туыс түрлерінің субэпидермальды инфекциясынан беткі инфекциясы басым болды. Бұл саңырауқұлақ түрлері бадананың сапасына айтарлықтай әсер етіп, зақымданғандарының өнуі мен тіршілікке қабілеттілігін айтарлықтай төмендетті. Ең зақымданған эксклюзивті сорт Tulipa Dynasty, ал ең төзімдісі Tulipa Delta Storm болды.

Аурудың таралуы (Р%) және дамуы (R%), ылғалды камера әдісімен, КДА-да (картоп-декстрозды агар) *Penicillium sp.* өсіру, микроскопиялық талдау, сондай-ақ ПТР (полимеразалы тізбекті реакция) талдау әдістерімен анықталды. ПТР талдауының нәтижелері бойынша жылыжай жағдайындағы қызғалдақтарға негізінен *Talaromyces variabilis (Penicillium variabile)* түрі әсер ететіні анықталды, пенициллездің таралуы 2021-2022 жылдар аралығында орташа есеппен 7%-9%-ға шамасында болды.

Салыстыру нәтижесінде штамм түрі анықталды. Сәйкестендіру нәтижесінде анықталған саңырауқұлақ атауларының маңыздылығы, түр атауларының дұрыс жазылуы Мусобанк ақпараттық базасының номенклатурасы арқылы тексерілді.

Кілтті сөздер: қызғалдақтар, фитопатогенді саңырауқұлақтар, пенициллез, таралуы, ПТР талдауы.

МРНТИ: 68.37.29

Н.Н. САЛЫБЕКОВА^{1*}, А.К. АПУШЕВ¹, Б.Ю. ЮСУПОВ¹, Г. КАХРАМАН²,
Б.Б. ТОЙЖИГИТОВА¹, А.Ш. МАМБАЕВА³

¹Международный казахско-турецкий университет имени Ходжи Ахмеда Ясави, Туркестан
Казахстан

²Университет Эрджес, Кайсери, Турция

³Евразийский технологический университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: nurdana.salybekova@ayu.edu.kz

ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ РОДА *PENICILLIUM SP.* НА ТЮЛЬПАНАХ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.04.14

Аннотация

Болезнь растений - очень сложный патологический процесс. Среди болезнетворных микроорганизмов, поражающих растения, основное место занимают фитопатогенные грибы. Одним из них является возбудитель грибковой болезни пенициллеза - *Penicillium sp.*. Цель работы - определение распространения и видового состава грибов рода *Penicillium sp.*. Выявлены биоэкологические особенности возбудителя заболевания, поражающего тюльпаны, выращенные в открытых и тепличных условиях. У родственных видов тюльпанов поверхностная инфекция преобладала над субэпидермальной. Эти виды грибов оказали значительное влияние на качество луковицы, значительно снизив всхожесть и жизнеспособность пораженных растений. Самым подверженным поражению эксклюзивным сортом оказался вид *Tulipa Dynasty*, а самым устойчивым - *Tulipa Delta Storm*. Распространение и развитие болезни (Р%) определяли методом влажной камеры, культивированием *Penicillium sp* на КДА (картофельно-декстрозный агаре), микроскопическим анализом, а также ПЦР (полимеразная цепная реакция). Результаты ПЦР-анализа показали, что тюльпаны в тепличных условиях в основном поражаются грибами *Talaromyces variabilis (Penicillium variable)*, распространенность пенициллеза в среднем составляла 7-9 % в период с 2021 по 2022 годы.

В результате сравнения установлен вид штамма. Актуальность названий грибов, выявленных в результате идентификации, правильное написание названий видов проверялись с помощью номенклатуры информационной базы Mucobank.

Ключевые слова: тюльпаны, фитопатогенные грибы, пенициллеза, распространенность, ПЦР анализ.

Тюльпаны (*Tulipa spp.*) одно из самых распространенных декоративных растений. Из 42 дикорастущих видов тюльпанов, произрастающих в Казахстане, 18 занесены в Красную книгу Казахстана. Во многих странах, где встречаются тюльпаны, это необычное растение занесено в Красную книгу как редкое декоративное растение. Многочисленные исследования доказали, что горная Центральная Азия, в том числе Казахстан, является основным центром роста диких тюльпанов [1-4]. Весь мир признал Казахстан родиной тюльпана, но к сожалению в Казахстане нет своих сортов, нет и системной интродукционной, селекционно-семеноводческой работы по тюльпанам, не изучаются влияние элементов технологии выгонки и размножения, применительно к субаридным условиям юга и юго-востока Казахстана, рекомендуемые поставщиками посадочного материала. К использованию на территории РК допущены всего 9 сортов тюльпана, а после 2009 года не рекомендован ни один сорт [5, 6].

В Казахстане выгонкой цветов занимаются многие цветоводы, используя посадочный материал и технологии Нидерландов, Турции и других стран. В озеленении населенных мест Казахстана используются сорта, не получившие допуска на территории РК.

Цветковые растения, относящиеся к группе лилиевых в целом, играют важную роль в озеленении населенных пунктов, среди которых тюльпаны все чаще используются в этих

целях. Благодаря высокой приспособляемости их выращивают в различных климатических зонах, используют в декоративных целях для создания цветников из-за особенностей весеннего цветения [7, 8]. Актуальная проблема, которая требует решения наряду с правильным применением технологий их выращивания - реализации защитных мер по профилактике комплекса болезней для достижения поставленных целей [9].

Грибы рода *Penicillium sp.*, принадлежащие классу *Ascomycetes*, ряду *Eurotiaceae*, семейству *Triphokomovye*, вызывают пенициллез у различных луковичных культур и ряда растений. Больные виды существенно влияют на правильный рост и созревание растений тюльпанов. Этот вид болезни наносит вред подземным луковицам не только в период хранения луковиц, но и в период вегетации [10]. Одним из важнейших исследований является точное определение и разделение патогенного вида возбудителя. Идентификация вида является основным этапом всех биологических исследований. Правильная идентификация, наряду с биологическими, экологическими особенностями каждого вида, является началом определения физиологического и биохимического состава, а также разработки мер борьбы с заболеванием, вызываемым грибами. Наряду с описанием морфологических особенностей в определении таксономического вида одним из важных шагов является система идентификации, основанная на разнообразии последовательностей ДНК видов грибов.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены в Ботаническом саду Международного казахско-турецкого университета им.Х.А.Ясави в 2021-2022 годах. В изучение были включены 5 сортов тюльпанов голландской селекции Albatros, Delta storm, Fun for two, Strong power, Dynasty. Изучаемые сорта относятся к садовому классу «Триумф».

Чистые культуры грибов выращивали на картофельно-декстрозном агаре при температуре +27°C. Спустя 10 суток после разделения на колонии и получения биомассы для анализа 18SpPHK, работы по выделению ДНК проводились согласно протоколу метода СТАВ.

Концентрация ДНК 900 нг/мкл измерялась (OD260) с помощью спектрофотометра (Nanodrop Thermo ND-1000, Thermo Scientific, Массачусетс, США).

При проведении работ использовали следующие методики: визуальную оценку распространенности (Р%) и развития болезни, биологической эффективности препаратов, методы влажной камеры.

Для дальнейшего использования образцы ДНК хранились при температуре 4°C. Каждая реакция ПЦР проводилась в конечном объеме в 50 мкл и состояла из 10-кратного буфера Taq с 5,0 мкл KCl (Thermo Scientific, Массачусетс, США), 2,5 мМ MgCl₂ 3,0 мкл, 100 мм 8,0 мкл дНТФ, 1 мкл от каждого праймера, 5U/мкл Taq-ДНК-полимераза-рекомбинант (Thermo Scientific, Массачусетс, США) 0,25 мкл, 27,8 мкл стерильной дистиллированной воды и 4 мкл суспензии ДНК вида грибного организма (100 нг), используемая в качестве образца.

Результаты и обсуждение

Поверхностная инфекция преобладает над субэпидермальной инфекцией родственных видов, относится к типу гриба, который развивается на луковичной или семенной поверхности. Было замечено, что микромицеты после сохранения исходного материала формируют популяции сапротрофных видов с благоприятными условиями (рисунок 1). Эти виды грибов оказали значительное влияние на качество луковицы - снижают всхожесть и жизнеспособность поврежденных особей.



Рисунок 1-Хранение луковиц и формирование клубнелуковицы на ранних стадиях вегетации в теплице

В результате наблюдения за типом заболевания установлено, что в период с 2021 по 2022 год распространенность пенициллеза по 5 базовым сортам в 2022 году составила 7,2%. Наиболее пораженным сортом является сорт *Dynasty* ($R = 8,9\%$), а наиболее устойчивым - *Delta Storm* ($R = 2,1\%$).

При температуре $+7^{\circ}\text{C}$ распространенность заболевания составила 6,5%, при $+10^{\circ}\text{C}$ - 9%, высокий процент распространенности пенициллеза обусловлен нарушением технологического процесса и резкими перепадами температуры [11].

Идентификация видов, принадлежащих к роду *Penicillium*, является сложным процессом, поскольку они различаются по своему разнообразию. Для детальной диагностики видового состава мы использовали метод ПЦР-анализа. Чистые насаждения грибных видов выращивали на картофельно-декстрозном агаре (КДА) при температуре $+27^{\circ}\text{C}$ (рисунок 2).

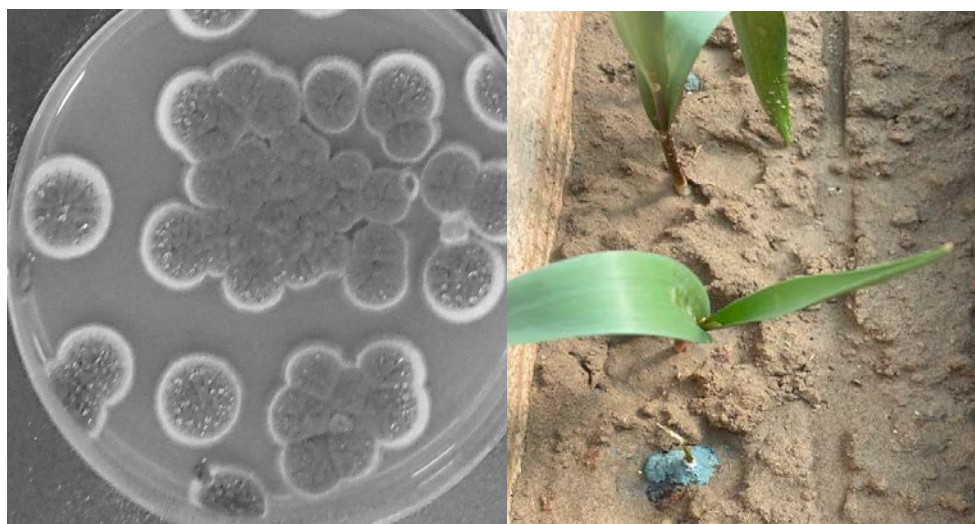


Рисунок 2 - Чистые культуры *Penicillium* и повреждение луковицы

Проведено исследование луковиц *Tulipa L.* на чистую культуру возбудителя пенициллеза, т.е. по одному штамму. Для проведения филогенетического анализа изученный штамм сравнивали с родственными видами *Penicillium* и другими грибковыми изолятами в базе данных GenBank.

Тест ДНК по программе амплификации ПЦР 5.8 S праймеры ITS1 и ITS4 ITS1 - TCCGTTAGGTGAACCTGCG и ITS4 - TCCTCCGCTTATTGATATGC использовался для создания последовательности генов, кодирующих рРНК, и внутренних спейсеров транскрипции. 3 минуты обеспечивают денатурацию при температуре +95°C, что составляет 35 оборотов при +95°C - 30 секунд, +57°C - 50 секунд и +72°C - 30 секунд, а конечная стадия элонгации проводилась в течение 5 минут при +72°C. Программа ПЦР для праймеров NL-1 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG и NL-4 GGTCCGTGTTTTCAAGACGG для амплификации домена D1/D2 в гене 26s рРНК обеспечивает денатурирование при температуре +95°C 3 минуты, что составляет 35 оборотов при +95°C -30 секунд, +52°C -50 секунд и +72°C- 30 секунд, с конечной стадией элонгации +72°C 5 минут [12-14].

Амплифицированные продукты ПЦР (10 мкл) и 100 п. н. стадии ДНК (Thermo Scientific, Массачусетс, США) 0,5 х ТАЕ 1 час 30 минут определяются в буфере 80 в/см с помощью электрофореза 1,5% гелем агарозы. Агарозный гель бромид этидий (0,5 мкг/мл) помещали на 10 минут. Гель снимали на фото с помощью системы фотосъемки под ультрафиолетовым светом [15, 16]. Секвенирование генов рРНК 18s и рРНК 5.8 S проводилось на автоматическом секвенаторе АЕ 3000 (Applied Biosystems, США). Полученная нуклеотидная последовательность использует онлайн-сервис BLASTn, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast] и была сравнена с информационной базой GenBank.

В результате сравнения был выявлен вид штамма. Актуальность названий грибов, выявленных в результате идентификации, правильное написание названий видов проверялись с помощью номенклатуры информационной базы Mucobank.

Для определения филогенетического родства похожих видов был использован метод сравнения нуклеотидных последовательностей области ITS1 и ITS2, кодирующего ген 18S рРНК и внутренних спейсеров-транскрипторов. Последовательности, полученные при секвенировании последовательности генов, кодирующих 18S рРНК, и фрагмента ДНК области ITS1 и ITS2 внутренних спейсеров-транскрипторов, приведены в таблице 1.

Таблица 1- Последовательность генов, полученных при секвенировании фрагмента ДНК

Кодируемый ген	Нуклеотидная последовательность
1	2
18S рРНК	GKSGRRGGGAAWCAWAGGTATAAGCACTTTGTAAGTGTGAAACTGCGAATG GCTCATTAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCCTACTACATGGATACC TGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGCAAAACCCCGACTTCGGAAGGG GTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTC ATAATAACTTAACGAATCGCATGGCCTTTCGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAA TTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGGTGGCA ACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAC GGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA TCCGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATATAGGGCTCTTTGGGTCTTA TAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCTCTTAACGAGGAACAATTGGAGGG CAAGTCTGGTGCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTA AAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCCGTCTGCGG GTCCGCTCACCGCGAGTACTGGTCCGGATGGGTCTTTCTTTCTGGGGAAT CCCATGGCCTTCACTGGCTGTGGCGGGGAACCAGGACTTTTACTGTGAAAA AAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTTTGCTCGGATACATTAGCATGGAATA ATAAAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGYAAY GATTAATARGATAGTCGGGGGCGTCAGTATCAGCTGTCAGAGGTGAAATTC TTGGATTTGCTGAAACTAAYTACTGMCGAAAGCATTCCGCAAGAKGTTTTTC ATTATCAGGAAYKGAAGTTAGGGGGATTSAAGAAARCGAKCTSGKAATWG CAST

Продолжение таблицы 1

1	2
5,8S рPHК	GGGATGGTATCTCGTCTTATTGATATGCGCAGGTTACCTACGGCAAKCMK GGSGGYCTAGAKGGAAGACCAGCGCCSACCGAATCCCTCCCGAGCGGGTG ACAGAGCCCCATACGCTCGAGGACCCGACGCGGGCGCCGACTGCTTTTGG GGCGTGTCCCCGGGGGGACAGCACCCAACACCCAGCCGTGCTGGAGGGCA GAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATG TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCACATTACTTATC GCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA AAGTTTTAATGATTTAAAATCTCACTCAGACTCACTGTTTCAGGCAGGGTCT AGGGTGTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCAGAAGCCCCCGGCGACCG GGGCCAGGCCCCAGTGGGCCCGCCGAGGCAACGCGGTAACAGTAAACACG GGTGGGAGGTTGGGCTCGTTCGAACCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCA GGTTCACCTACGGAAG
26S рPHК	CCCCGTGGCAACGCCACACSTACTGTGTGTCATCGGCTASAGCTTARATTTG AAATCCGGCTCCTTCGGGGCCCCACTTGKMATTTGGAGAGGATGCTTCGGG CGTGGCCCCCTATCTAAGTGCCCTGGARCGGGCCGYCWTAGAGGGTGAGAA TCCCGTCTGGGATGGGTGGTCCCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCG AGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGAGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTA AATATTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAA AAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA GCATTGGCAACCAGACTTGCTGGGGGAGGCTCAGCCGGCACGTGTGCCGGT GCACTCCTCCCCGGCAGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGTTCGGTCAAAGGCC TGGGAATGTAGCACCTTCGGGGTGCCTTATAGCCCGGGGTGCCATGCGAC CTGCCCGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCTGGCGTAATGGTTGT CAATGGCCCGTCTTGAACACGGACC

Анализ сходства нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего исследуемый штамм 18s рДНК, проводился сервером BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>].

Первоначальный скрининг базы данных GenBank показал, что исследуемый штамм принадлежит к следующей систематической группе: *Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Trichocomaceae; Talaromyces*.

Штаммы, участвующие в анализе, и уровень сходства 18S последовательностей рДНК исследуемого штамма показаны в таблице 2.

Таблица 2 - Сходство последовательностей, кодирующих домен D1/D2 гена 26s рPHК

Описание	Покрытие	Процент совпадений	Образец
1	2	3	4
Penicillium variable strain DAOM 216318 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	95%	98%	JN938974.1
Penicillium rugulosum strain DAOM 216317 18S ribosomal RNA (SSU) gene, partial sequence	95%	98%	JN938973.1
Penicillium sp. 12-02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	EU667999.1
Penicillium phialosporum strain KCTC16070 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245265.1
Penicillium rugulosum strain KCTC16050 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245232.1
Penicillium sp. DspF10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	KT958531.1
Penicillium phialosporum strain KCTC16053 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245235.1

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Penicillium tardum strain KCTC16068 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	98%	AF245256.1
Penicillium sp. MF555 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	KM096353.1
Talaromyces rugulosus strain 10.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	KF018457.1
Penicillium variabile strain KCTC16056 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	97%	AF245238.1
Penicillium sp. KCTC16061 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245247.1
Penicillium purpurogenum strain KCTC6785 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245246.1
Penicillium crateriforme strain KCTC6784 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245228.1
Penicillium purpurogenum strain KCTC4777 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245248.1
Penicillium purpurogenum strain KCTC16055 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245237.1
Talaromyces viridis gene for 18S rRNA, strain: CBS 114.72	95%	96%	AB024587.1
Penicillium pinophilum isolate MR-2 18S rDNA partial sequence gene, complete sequence	92%	97%	JN222360.1
Penicillium sp. KCTC16067 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245254.1
Penicillium sp. 26.21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	97%	KF018476.1
Penicillium pinophilum strain KCTC16057 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	96%	AF245239.1
Penicillium sp. DspF9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	88%	98%	KT958530.1

Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97% [17]. Метод сравнения нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген 5,8 S, также использовался для установления филогенетических связей ближайших родственных видов. Последовательности, полученные при секвенировании последовательности генов, кодирующих 5,8 S рРНК, и части ДНК области ITS1 и ITS2 внутренних спейсеров-транскрипторов, приведены в таблице 3 [18, 19].

Штаммы, участвующие в анализе, и уровень сходства последовательностей, кодирующих домен D1/D2 гена 26s рРНК исследуемого штамма, показаны в таблице 3.

Таблица 3 - Сходство последовательностей, кодирующих домен D1/D2 гена 26s рРНК

Описание	Покр ытие	Описа ние	Покрытие
1	2	3	4
Penicillium variabile strain KUC1476 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	98%	HM469398.1
Penicillium variabile strain DAOM 216318 28S ribosomal RNA (LSU) gene, partial sequence	94%	97%	JN938936.1
Fungal endophyte isolate ABS-95-R2-b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	95%	KM657064.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0050 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	97%	KF673601.1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0028 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	97%	KF673579.1
<i>Penicillium variabile</i> strain NRRL 58760 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	97%	HQ698594.1
<i>Penicillium variabile</i> strain NRRL 6419 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	96%	HQ288049.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0175 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	97%	KF673712.1
<i>Talaromyces rotundus</i> large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	95%	AF285116.1
Fungal endophyte voucher ARIZ:DM0130 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	97%	KF673664.1
<i>Penicillium</i> sp. NRRL 35203 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	93%	EF634390.1
<i>Penicillium resedanum</i> strain NRRL 578 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	93%	AF033398.1
<i>Penicillium marneffei</i> gene for large subunit rRNA, partial sequence, strain: IFM 41708	94%	90%	AB363755.1
Fungal sp. F260 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	82%	93%	JQ747696.1
<i>Penicillium marneffei</i> gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	94%	90%	AB219804.1
<i>Penicillium</i> sp. HSD07B 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	90%	HM367083.1
<i>Penicillium verruculosum</i> 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	94%	90%	AF510496.1
<i>Rasamsonia</i> sp. CCF 5289 genomic DNA sequence contains ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, strain CCF 5289	94%	90%	LT548281.1
<i>Penicillium</i> cf. <i>resedanum</i> MU-52 isolate 52 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	93%	EF100952.1
<i>Penicillium oblatum</i> gene for 28S rRNA, partial sequence, strain:IFO 33091	94%	90%	AB047230.1
<i>Paecilomyces pascuus</i> gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: IFO 33090	94%	90%	AB047229.1

Филогенетический анализ родства, проведенный с использованием штаммов близкородственных микроорганизмов, показал, что наиболее близким видом к исследуемому штамму является *Talaromyces variabilis* (*Penicillium variabile*).

Результаты и обсуждение

Широко распространенный грибковый патоген *Penicillium variabile*, поражающий многие сельскохозяйственные культуры, особенно при хранении их вместе с семенным материалом, приводит к значительной потере всходов. При повреждении луковиц тюльпана мицелий гриба обычно образуется на поверхности соприкосновения, но постепенно распространяется на все ткани растения. Установлено полное разрушение органов растения из-за микотоксинов, выделяемых грибами.

По морфологическим характеристикам и молекулярным исследованиям гриба, поражающего тюльпаны, определен тип изолята. Морфологическое исследование роста колоний в КДА и результаты цветового и микроскопического анализов позволили провести видовую идентификацию гриба.

Известно, что для идентификации вида микроорганизма недостаточно использовать только морфологические признаки. Для точного определения вида гриба необходимо применение ПЦР-метода. Для определения филогенетического родства похожих видов использовался метод сравнения нуклеотидных последовательностей 18S рРНК, 5,8 S рРНК, 26s рРНК кодирующего гена и внутренних спейсеров-транскрипторов ITS1 и ITS2. Филогенетический анализ родства показал, что наиболее близким видом к исследуемому штамму является *Talaromyces variabilis* (*Penicillium variabile*).

Финансирование

Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (Грант № AP14870298).

Литература:

- 1 Stikhareva T., Ivashchenko A., Kirillov V., Rakhimzhanov A. Floristic diversity of threatened woodlands of Kazakhstan formed by *populus pruinosa schrenk.* In: *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45, V 2. 2021:165 – 178. (DOI:10.3906/tar-2006-70)
- 2 Шарипов А., Пуратов У. *Лолалар*. Тюльпаны. Ташкент, Узбекистон миллий энциклопедияси, 1997, 144.
- 3 AL-Chalabi, Angham Talal Mahmoud. Effect of adding yeast solution and soil mixture on growth and bulbs production traits of tulip (*Tulipa generiana* L.). In: *Indian Journal of Ecology* V. 47, 2020:252 – 257.
- 4 Khaleghi A.; Khadivi, A., Zonneveld Ben J. M.b. Morphological variations among and within species of wild tulip (*Tulipa* L.) from Iran. In: *Genetic Resources and Crop Evolution*. V.65(8). 2018:2241 – 22661. (DOI: 10.1007/s10722-018-0688-4)
- 5 Иващенко А.А. Белялов О.В. *Казахстан-родина тюльпанов*. Алматы., «Атамұра», 2019,368.
- 6 Введенский И.А. Род 272. *Тюльпан Tulipa* L. Флора СССР. Т. 4. Л.: Изд-во АН СССР, 1935, 760.
- 7 Kashin A.S., Petrova N.A.; Shilova I.V. Some Features of the Environmental Strategy of *Tulipa gesneriana* L. (Liliaceae, Liliopsida). In: *Biology Bulletin*. V 44(10). 2017:1237–12451. (DOI: 10.1134/S1062359017100053)
- 8 Khaleghi A.; Khadivi, A., Zonneveld Ben J. M.b. Morphological variations among and within species of wild tulip (*Tulipa* L.) from Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution*. V 65(8). 2018: 2241 – 22661. (DOI 10.1007/s10722-018-0688-4)
- 9 Zonneveld B.J.M., J.J. de Groot. *Tulipa kolbintsevii* Zonn. a new species from Eastern Kazakhstan. In: *Plant Syst Evol.*, V. 298. 2012:1293–1296 (DOI: 10.1007/s00606-012-0635-3).
- 10 Ахатов А.К., Джалилов Ф.С., Белошапкина О.О., Стройков Ю.М., Чижов В.Н. *Защита растений от болезней в теплицах: справочник*. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002, 464.
- 11 Зайцева Е.Н., Былов В.Н. *Технология выращивания луковиц тюльпанов для выгонки: метод. указания*. М.: Агропромиздат, 2008, 55.

12 Wilson B., Dolotbakov A., Burgess B.J., Clubbe C., Lazkov G., Shalpykov K., Ganybaeva M., Sultangaziev O., Samuel F. Central Asian wild tulip conservation requires a regional approach, especially in the face of climate change. In: *Biodiversity and Conservation*, 2021, 30:1705–1730 (doi:org/10.1007/s10531-021-02165-z)

13 E. De Clerck, T. Vanhoutte, T. Hebb, J. Geerinck, J. Devos, and P. De Vos. Isolation, Characterization, and Identification of Bacterial Contaminants in Semifinal Gelatin Extracts. In: *Applied and Environmental Microbiology*, June 2004:3664–3672.

14 Yang, Lu., Liao X., Cheng P., Zhang Zhi-Gang., Li H. Composition and diurnal variation of floral scent emission in *Rosa rugosa* Thunb. and *Tulipa gesneriana* L. In: *Open Chemistry*. V.18(1). 2020:1030-1040. (DOI: 10.1515/chem-2020-0087)

15 Horton T.R., Burns T.D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. In: *Molecular Ecology*. V. 10. 2001:1855-1871.

16 Saubenova M.G., Olejnikova E.A., Ermekbaj ZH.N., Ajtzhanova A.A., Bokenov D.D., Potoroko I.YU. Mikrobiologicheskie aspekty vyrashchivaniya vysshih gribov. *Mikrobiologiya i virusologiya*. V.3(34). (doi:org/10.53729/MV-AS.2021.03.01)

17 Kashin A.S., Petrova N.A.; Shilova I.V. Some Features of the Environmental Strategy of *Tulipa gesneriana* L. (Liliaceae, Liliopsida). In: *Biology Bulletin*. V.44 (10). 2017:1237 – 12451. (DOI: 10.1134/S1062359017100053)

18 Clerck E.De., Vanhoutte T., Hebb T., Geerinck J., Devos J., Vos P.De. Isolation, characterization, and identification of bacterial contaminants in semifinal gelatin extracts. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 2004:3664–3672.

19 Prashant K., Mishra R.T.V., Culham F.A. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiology Letters*. 2003:329–332. (DOI: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11537.x)

IRSTI: 69.25.03

B.B. MAKHATAYEVA¹, P.S. UALIEVA¹, G.Zh. ABDIEVA¹, E.K. ONGARBAYEV²,
A.S. NURMAGANBETOVA¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Institution of Combustion Problems, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: bmakhatayeva@mail.ru

STUDY OF THE DESTRUCTIVE ACTIVITY OF BIOSORBENT BASED ON OIL- OXIDIZING BACTERIA

doi:10.53729/MV-AS.2023.04.15

Abstract

The growth activity of oil oxidizing microorganism strains in the oil-contaminated areas and the efficiency of oil decomposition were studied. During the experiment, a microbial consortium was formed using selected strains of microorganisms which were then immobilized in sorbents made of carbonized shungite and rice husks. A biosorbent based on a consortium of microorganisms, *Pseudomonas poae* TM1, and *Pseudomonas migulae* TM2, along with carbonized shungite and rice husks, has shown promising results in the bioremediation of oil-contaminated areas.

Keywords: sorbent, oil-oxidizing microorganisms, consortium, biosorbent.

Currently, Kazakhstan is one of the largest oil producing countries. In Kazakhstan, soil pollution with oil and oil products is a big problem. In terms of negative impact on the environment, oil production occupies one of the leading positions among the sectors of the fuel and energy complex, which is due to the large-scale production and the eclipse of oil in the country. Its discharge into the environment leads to the destruction of the life of many organisms, as well as changes and degradation of ecosystems. Currently, microbiological methods are used to combat oil and oil products. Soil microorganisms play a major role in the process of detoxifying chemicals. The ability of microorganisms to break down oil is associated with a large number of biochemical reactions carried out by them and a high level of their adaptation. Pollution with oil and oil products has a very negative effect on the soil, reducing the quality and productivity of the land. Contaminated soil becomes toxic to plants, animals and humans, and in some cases can cause serious poisoning and death.

Because of environmental disasters associated with accidents in deposits where mining occurs, soil pores become clogged, making it hydrophobic and usually leading to a decrease in water storage capacity. Oil and oil product spills are possible through the direct production, transportation, processing and use of hydrocarbons. When entering the environment, oil or petroleum products negatively affect the ecosystem, while significantly changing the pH level and the degree of aeration of the soil [1].

Among the measures taken in order to protect the environment from oil pollution, one of the most promising and environmentally safe methods is the method of soil bioremediation, which is based on the ability of some microorganisms to destroy oil and oil products. The ability of microorganisms to convert or decompose oil hydrocarbons is known and allows them to be used for bioremediation of contaminated areas [2].

Bioremediation is one of the most promising methods for cleaning oil-contaminated soil. It is based on the ability of microorganisms and other living organisms to break down and destroy various hydrocarbons. In the natural environment, there is no waste, biodegradation occurs continuously, and everywhere; any organic matter can provide nutrients to the entire complex of microorganisms and eventually Mineralize organic matter to form carbon dioxide and water.

It is known that carbon materials and composites containing some mineral and plant materials are promising in the use of microbial cells as carriers. Such carrier sorbents are capable

of high chemical resistance, mechanical strength, ion exchange properties, sufficient permeability to water and other substrates, biocompatibility and processing [1].

The distinctive properties of the main carrier sorbents are that they are made from cheap and affordable pyrolysis products of plant residues from agriculture and woodworking, as well as zeolites enriched with trace elements and some other examples of natural aluminosilicates and oxides. Immobilized microorganisms, along with free cells, have several advantages, so high bioremediation efficiency can be achieved by using immobilized microorganism cells in cleaning contaminated ecosystems [3].

Increasing the effectiveness of biological products can be achieved with immobilized destructor cells in various carriers. This is because the adhesion of cells to hard surfaces ensures a high concentration of microbial cells in the zone of action, prevents their leaching, protects against the effects of high concentrations of toxic oil components, and allows you to increase the specific destructive activity of microflora [4].

The purpose of this article is to compare the ability of *Pseudomonas poae* TM1 and *Pseudomonas migulae* TM2 to a consortium of microorganisms and a biosorbent based on carbonized shungite and rice husk and a sorbent based on carbonized shungite and rice husk to bioremediate oil-contaminated areas.

Materials and methods of research

Determination of the number of different groups of microorganisms

To identify pollutant-resistant physiological groups, the number of different groups of soil microorganisms was determined, and the microbiological composition of soil microflora in areas adjacent to warehouses was compared using the sequential dilution method of soil suspension in dense culture media. The number of cells was determined using the Koch method, which involves seeding a specific volume of the studied microorganism suspension into petri dishes containing a dense medium. The colonies that grew after incubation were then counted. Sowing was performed in petri dishes in an agaric medium. Meat-peptone agar (MPA) was used to determine the total number of microorganisms, wort agar (WA) to assess the content of fungi in the soil, and specific culture media were employed to determine the number of different physiological groups of microorganisms. Molds were considered using the agaric medium of Czapek dox, ammonifying bacteria in agar based on fishmeal hydrolysate, nitrogen-fixing bacteria in the Ashby medium, and aerobic cellulolytic bacteria in the dense growing medium of Hutchinson and Clayton.

Cultivation of crops at a temperature of 28-30°C in the thermostat was carried out for 2 days to isolate heterotrophic bacteria, actinomycetes, nitrogen-fixing and mold fungi were isolated for 5-7 days and cellulolytic bacteria for 7-9 days. After crop incubation, a quantitative calculation of the colonies that grew was carried out and the number of colony-forming units (CFU) in 1 g of soil was determined.

Methods for isolating pure strains from soil samples

Obtaining pure strains was carried out by mechanical separation on the surface of a dense culture medium (Loop annealing method) [5]. Individual colonies were tested for purity by microscopy and sown in oblique nutrient agar for cultivation.

Methods of studying morphological-cultural, physiological-biochemical properties of isolated microorganisms

The study of morphological, physiological and biochemical features of bacteria was carried out according to generally accepted methods. Morphological and cultural properties of pure cultures of separated microorganisms were studied based on the following features: cell shape and location, cell size, cell mobility, presence of endospores, staining by Gram, characteristics of a colony in a solid culture medium, growth pattern in a liquid culture medium, and growth pattern in an oblique Agar. The physiological and biochemical properties of bacteria and yeast were determined based on the following features: bacterial reproduction at 42°C, hydrolysis of gelatin, starch, casein, the presence of catalase and the use of molecular nitrogen, fermentation of various carbohydrates and alcohols [6].

Obtaining bio destructors based on immobilized microorganism cells

Sorption cell immobilization was carried out as follows:

100 ml of cell suspension in an isotonic NaCl solution in the presence of carriers at the rate of 1 g per 100 ml of medium, incubated for 48 hours in an Erlenmeyer flask at room temperature, shaken at 220 rpm in a laboratory shaker. The carrier with immobilized cells was then washed with isotonic solution from weakly attached cells and the number of desorbed cells was determined.

Methods for determining sorption and desorption of cells:

To assess the degree of sorption and desorption of cells, cell concentration in solution was measured by the optical density of the suspension in standard cuvettes with an optical path length of 1 cm, a wavelength of 540 Nm using a KFK - 2MPA photocolormeter, in "sharp" experiments [7].

A calibration curve was constructed to determine the relationship between cell number and optical density.

The number of attached cells was calculated based on the difference in the initial and final values of the optical density of the samples. The proportion of adsorbed cells was determined by the Nikovskaya method:

$$\% = 100 \times \frac{D_{exp}}{D_{pri}} \quad (1)$$

where, D_{exp} is the optical density of the original suspension

D_{pri} – optical density of experimental samples.

Cleaning oil from the soil through the Soxlet. The prepared soil loop was placed in a prepared sleeve of 10.00 G and obtained in the Soxlet apparatus by adding 70 ml of chloroform for 8 hours. After extraction, the volume of the extract was measured with a measuring cylinder. All analyzes were carried out in two parallels [8].

Preparation of sowing material. To obtain biomass from a consortium of oil destructors, microorganisms were grown individually in an optimal medium of 10^9 CFU/ml of liquid with a cell titer in a thermoshaker (220/min) for 2 days under aeration and at a temperature of 28°C. The inoculate was transferred from the sowing medium to the optimal nutrient medium. To do this, 100 ml of the nutrient medium was introduced into 500 ml flasks. The strains were grown at a temperature of 28°C to 10^{10-12} CFU/ml cell titer for 2 days. After 48 hours, the total number of cells of microorganisms was determined. To obtain the required amount of biomass, the cell suspension was replaced with the INOBIO-5BG bioreactor.

Results and discussion

Extraction of biomass from the community of destructor strains for bioremediation of oil-contaminated soils

Bioremediation technologies are being used more widely compared to physical and chemical recovery methods due to their high efficiency, low cost and harmlessness of products (mainly CO₂ and water) [9]. The most important factors for bioremediation are the size and activity of microorganisms, soil nutrients, and oxygen state. However, oil-contaminated soil usually has a low number of microbes, low porosity, and nutrients, which limits the decomposition efficiency of microorganisms in practical applications [10-12].

Natural purification of natural objects from oil pollution is a long process; therefore, the problem of restoring oil-contaminated soil, in particular bioremediation, becomes especially relevant. A promising technology for cleaning oil-contaminated soil is considered to be the introduction into the soil of various complexes of microorganisms that are distinguished by an increased ability to biodegrade certain hydrocarbon components of oil and oil products [13].

In this regard, in conditions of complex pollution, the possibility of using destructive microorganisms capable of growing in an environment with high hydrocarbons and showing active biochemical activity, capable of biodestructors of these substances, is relevant.

An important condition for the effective transformation of xenobiotics is the absence of antagonism between destructor organisms. Microorganisms can use organic pollutants as the only source of carbon, which allows them to break down organic pollutants in the soil [14].

In the course of the work, the INOBIO-5BG bioreactor was used to obtain biomass (Figure 1). Bacterial strains were grown in an optimal liquid medium for 48 hours, the pH of the medium has a neutral value. In the course of the experiment, the number of viable cells of oil detractors was determined. The standard serial dilution method was used to determine the number of colony-forming units (CFU) in the culture suspension.

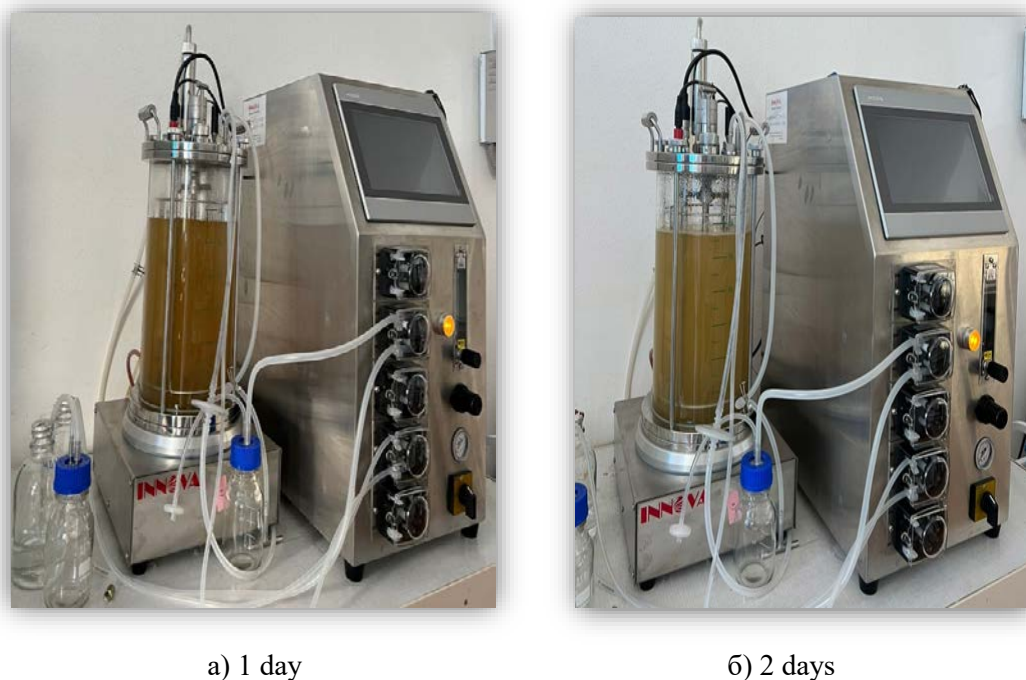


Figure 1- Cultivation of strain-destructors in INOBIO-5BG bioreactor

In Figure 1, in the bioreactor, on the 1st day, the nutrient medium is transparent, on the day 2, there is an active growth of strains and there is a clouding of the environment. Also, during cultivation, the number of viable cells of microorganisms in the culture fluid was determined after 24 hours and 48 hours (Figure 2).

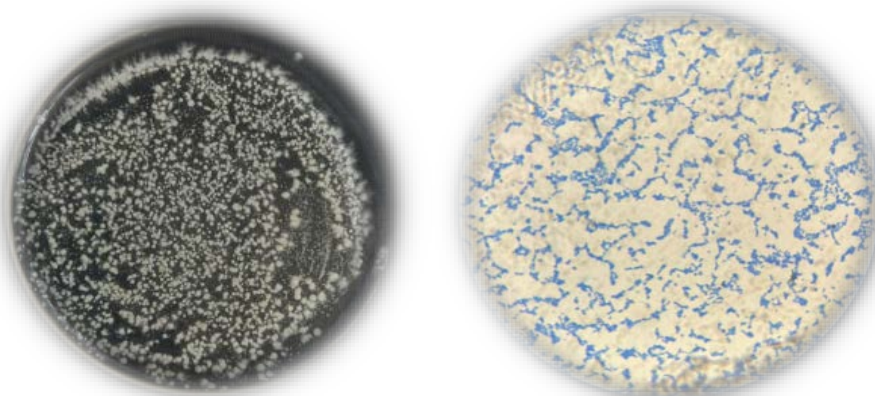


Figure 2 – Macro- and micromorphology of oil oxidizing bacteria grown in bioreactor

As can be seen from Figure 2, the cultures of the oil oxidizing bacteria are pure, with microscopy revealing cells similar in morphology. The number of homogeneous colonies and colony-forming units was 2.5×10^{10} CFU/ml.

Testing of sorbents made to clean the soil contaminated with specific oil

The development and improvement of technologies for bioremediation of areas contaminated with oil hydrocarbons is currently an active area of fundamental and Applied Research. Crude oil is a mixture of chemicals with hundreds of components. The main difference between oil produced in different geographical regions is not in the chemical composition, but in the composition of the individual component; the latter affects the chemical and physical properties of crude oil. Therefore, microbial associations consisting of two or more strains are now used in bioremediation, as the introduction of monoculture of hydrocarbon-oxidizing microorganisms into oil-reduced environment does not completely solve the purification problem [15].

In the course of the work, the destructive activity of a sorbent based on carbonized shungite and rice husk, as well as a biosorbent based on microorganisms, was studied in field conditions. The results of the experiment showed that, to increase the degradation of oil, it can be said that the use of mixed cultures consisting of several microorganisms and methods of immobilizing them on carriers are effective.

In the work, oil oxidizing microorganisms were combined into a new consortium on the principle of compatibility with each other. In these consortia, the destructive strains *Pseudomonas poae* TM1 and *Pseudomonas migulae* TM2 are used.

At the beginning of the experiments, oil-contaminated soil was prepared from a waste landfill near the village of Bayandy. The test site is located 35 km from the city of Aktau. The landfill is designed to store oil waste imported from oil fields engaged in oil production and refining. The plants are small, represented by Wormwood and sand male. The climate is moderately dry, the wind speed is 0.7 m/s, the air temperature during the period of cleaning measures was from 32°C to 35°C. at the beginning of the experiments, plots were prepared, the area of the site (3x3.5) is 10.5 m². The next step was the introduction of a sorbent and biosorbent based on carbonized shungite and rice husk (1:1.7); strains of oil-oxidizing microorganisms into oil-contaminated soil. After applying a biosorbent based on sorbent and oil destructors, the soil was moistened and loosened. To account for microorganisms in the soil, generally accepted methods used in microbiology were used.



Figure 3- Oil-contaminated soil of the landfill near the village of Bayandy

In Figure 3, it can be seen that the soil of the landfill is visually oily and has a pungent smell of petroleum products. The initial level of contamination with oil hydrocarbons was 158.2 g/kg of soil. After 10, 30, 60 days, soil samples were taken from the experimental site to determine the survival rate of microorganisms and determine their number. The degree of oil purification of the soil was also determined.

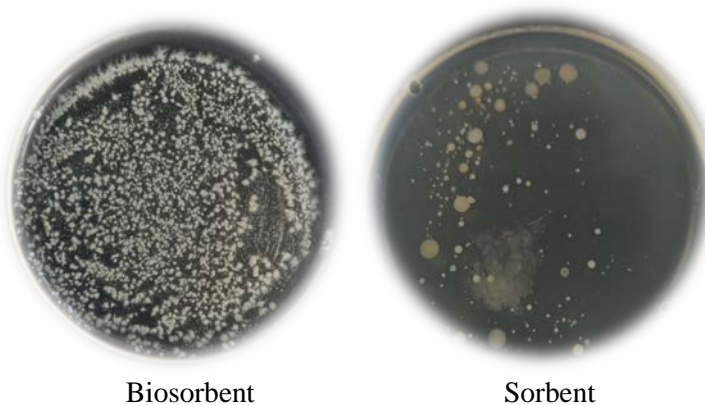


Figure 4- Microbial diversity of the oil-contaminated soil of the landfill

On the 10th, 30th and 60th day with the introduction of a biosorbent and sorbent based on destructors, morphological colonies similar to the introduced strains were identified on oil-contaminated soil. When introduced into the soil, it was found that the cells of oil oxidizing bacteria retained their viability during the experiment (Figure 3-4).

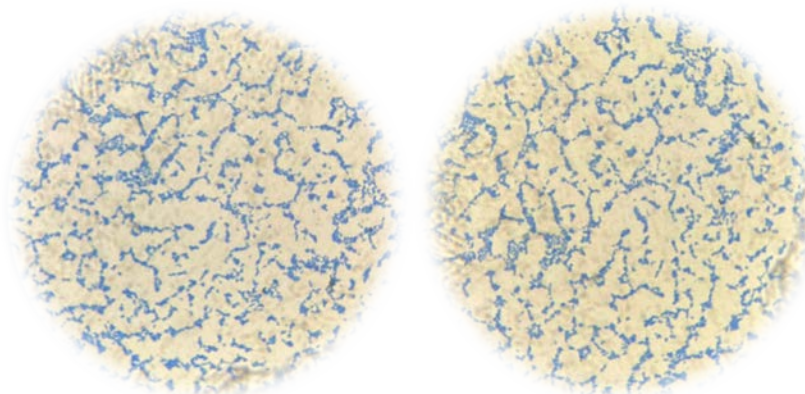


Figure 5 - Morphology of strain-destructors immobilized in sorbent

During the microscopy, rod-shaped, small cells were detected, characteristic of *Pseudomonas* in morphological features. Further in the work, the number of microorganisms in oil-contaminated soil from the experimental site of the landfill was studied (Table 1).

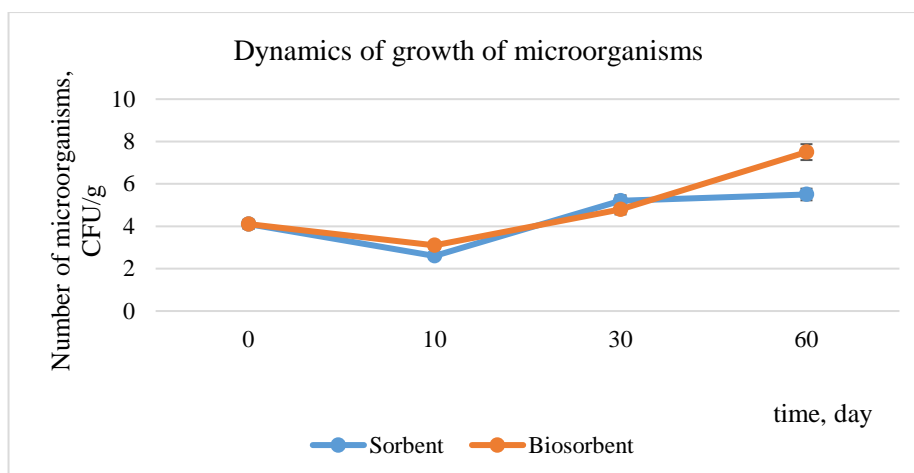


Figure 6 - The number of microorganisms in the oil-contaminated soil of the experimental site of the landfill

As can be seen from the figure, the number of microorganisms in the samples of the control soil was 4.1×10^6 CFU/g. On oil-contaminated soil of the experimental site of the landfill, the number of colony-forming units of microorganisms for the 10th day was 3.1×10^{10} CFU/g in the version with the introduction of biosorbent, 2.6×10^9 CFU/g in the version with the introduction of sorbent.

On the 30th and 60th days of a field experiment on soils contaminated with oil and petroleum products, microorganisms show a tendency to increase in numbers and their viability remains. So, on the soils where the biosorbent was introduced, by the 60th day, the number of microorganisms reached 7.5×10^{11} CFU/g and the sorbent reached 5.5×10^{10} CFU/g. When determining the number of microorganisms, the titer of viable cells will be much lower than when introducing culture into the soil at the beginning of the experiment. This indicates that oil maintains the viability and quantitative indicators of destructor cells, since for them oil and petroleum products are the only sources of carbon. The diversity of microorganisms capable of destroying oil and petroleum products is due to high competition and numerous ways of degradation of their various fractions. Microorganisms have the property of selective access to various hydrocarbons.

The work investigated the degree of soil purification from oil and oil products at the experimental site using a sorbent based on shungite and rice husk and a biosorbent based on oil destructors. The content of petroleum products in the soil was determined by the weight method after removing hydrocarbons from the soil suspension with hot hexane in the Soxhlet apparatus. Figure 6 shows data on the amount of oil in oil-contaminated soil after purification with the introduction of a sorbent and a biosorbent.

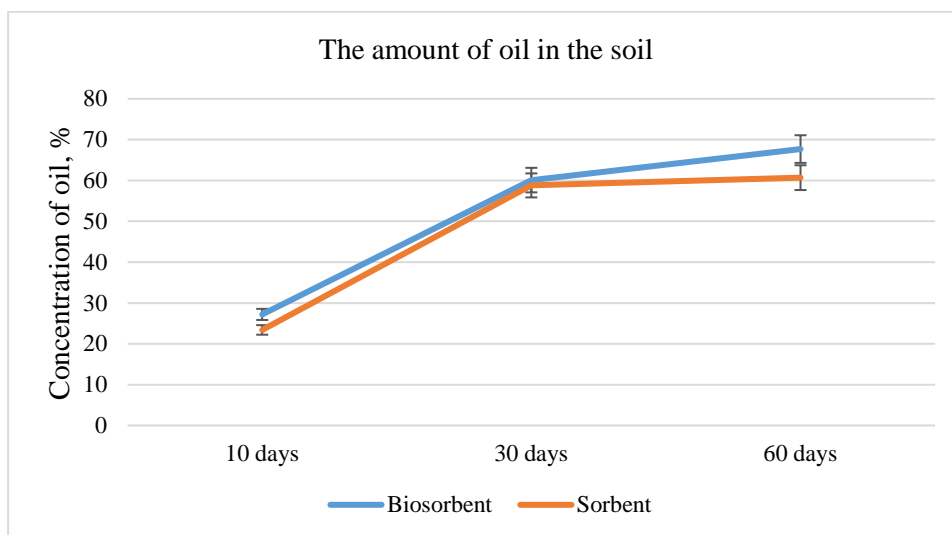


Figure 6 - Petroleum content in oil-contaminated soil after purification

After the introduction of the sorbent and biosorbent into the oil-contaminated soil of the landfill, soil samples were taken at 10, 30 and 60 days. In soil samples where biosorbent was introduced, oil degradation was 27.2% in 10 days, 60.1% in 30 days, and 67.7% in 60 days. In samples in which the sorbent was administered, oil degradation was 23.4% at 10 days, 58.8% at 30 days, and 60.7% at 60 days. Thus, as a result of the work, the oil content in the oil - contaminated soil of the landfill decreased from 23.4% to 67.7%.

Conclusion

In general, field tests carried out on specific oil-contaminated soils have shown the effective removal of oil hydrocarbons by a consortium of destructive strains based on immobilized crops and a carbonized rice husk and shungite-based sorbent. The results of the study of the destructive activity of biosorbent in field experiments showed that the oil content in the soil of the landfill with the addition of oil-contaminated sorbent and biosorbent decreased to 60.7% and 67.7%,

respectively. The results of preliminary scientific research will allow us to develop a technology for the treatment of oil and oil waste. The obtained results are of practical importance for cleaning oil-containing objects in the environment.

Funding

The work was carried out within the framework of the project AR08856559 "Development of sorbents on the basis of shungite pipes for oil and gas", funded by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

References:

- 1 Elizaveta, M., & Maria, U. Ecological aspects of sorbents use to improve the efficiency of bioremediation on oil-contaminated lands. *Revista Fuentes, el reventón energético*, 2021, 19(1): 65-73. (doi: <https://doi.org/10.18273/revfue.v19n1-2021006>)
- 2 Babaev E.R. Mikrobiologicheskaya destrukciya nefiti v pochvah Apsheronского poluostrova. *Territoriya neftegaza* 2011, 11: 64-69. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskaya-destruktsiya-nefti-v-pochvah-apsheronского-poluostrova>)
- 3 Gaur, N., Narasimhulu, K., & PydiSetty, Y. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of cleaner production*, 2018, 198: 1602-1631 (doi: [10.1016/j.jclepro.2018.07.076](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.076))
- 4 Kazankapova M. K. Sozdanie modifitsirovannykh uglerodmineral'nykh sorbentov dlya ochistki prirodnykh ob"ektov ot tekhnogennykh zagryaznenij. Dokt. dis. Almaty, 2013. (URL:<https://studylib.ru/doc/2096334/dissertacionnaya-rabota-kazankapovoj-m?ysclid=lo6qj51xbp396403342>)
- 5 Netrusov A. I. Bol'shoj praktikum po mikrobiologii. M., 2005.
- 6 Ignatova L.V. Osnovy mikrobiologii. Kazak Univer-ti, 2009.
- 7 Nikovskaya.G.N. Adgezionnaya immobilizaciya mikroorganizmov v ochistke vody. *Himiya i tekhnologiya vody*, 1989, 11(2): 158-169.
- 8 Drugov YU. S., Rodin A.A. Analiz zagryaznennoj pochvy i opasnykh othodov. M., 2007.
- 9 Ebadi A, Khoshkholgh Sima NA, Olamaee M, Hashemi M, Ghorbani Nasrabadi R. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *J Environ Manage*, 2018, 1(219): 260-268. (doi: [10.1016/j.jenvman.2018.04.115](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.115))
- 10 D. Borah and R. N. S. Yadav, Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain Egypt. *J. Pet.*, 2017, 26: 181–188 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>)
- 11 H. Cui, X. Yang, L. Xu, Y. Fan, Q. Yi, R. Li and J. Zhou, Effects of goethite on the fractions of Cu, Cd, Pb, P and soil enzyme activity with hydroxyapatite in heavy metal-contaminated soil. *RSC Adv.*, 2017, 7: 45869–45877 (doi: <https://doi.org/10.1039/C7RA08786A>)
- 12 H. Su, S. Mi, X. Peng and Y. Han, The mutual influence between corrosion and the surrounding soil microbial communities of buried petroleum pipelines. *RSC Adv.*, 2019, 9: 18930–18940. (doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA03386F>)
- 13 Kurakov A.V., Il'inskij V.V., Kotolevcev S.V., Sadchikov A.P. Bioindikaciya i reabilitaciya ekosistem pri pochvennykh zagryazneniyah. M., 2006. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-mikrobnoy-transformatsii-azota-i-ugleroda-v-usloviyah-neftyanogo-i-radioaktivnogo-zagryazneniya>)
- 14 Velacano, M. Castellanohinojosa, A. Vivas, A.F. Toledo, M.V.M. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. *Adv. Microbiol.*, 2014, 4: 644–655. (doi: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.410070>)
- 15 I.A. Pyrchenkova, A.B. Gafarov, I.F. Puntus. Vychor i harakteristika aktivnykh psihrotrofnnykh mikroorganizmov-destruktorov nefiti. *Prikl. biohim. mikrobiol.*, 2006, 42(3): 298-305. (URL: <https://www.dissercat.com/content/ekologo-funksionalnye-aspekty-mikrobnoi-remediatsii-neftezagryaznennykh-pochv>)

Б.Б. МАХАТАЕВА^{1*}, П.С. УАЛИЕВА¹, Г.Ж. АБДИЕВА¹, Е.К. ОНГАРБАЕВ^{1,2},
А.С. НҰРМАҒАНБЕТОВА¹

¹ Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

² Институт проблем горения, Алматы, Казахстан

*e-mail: bmakhatayeva@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕСТРУКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ БИОСОРБЕНТА НА ОСНОВЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Аннотация

Изучена активность роста штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненной зоне и активность разложения нефти. В ходе эксперимента были созданы микробные ассоциации из отобранных штаммов микроорганизмов и иммобилизованы на сорбенты из карбонизированных шунгитовых и рисовых шелух. Биосорбент на основе консорциума микроорганизмов *Pseudomonas poae* TM1 и *Pseudomonas migulae* TM2 и карбонизированного шунгита и рисовой шелухи показал многообещающее применение при биоремедиации нефтезагрязненных регионов.

Ключевые слова: сорбент, нефтеокисляющие микроорганизмы, консорциум, биосорбент.

FTAMP: 69.25.03

Б.Б. МАХАТАЕВА^{1*}, П.С. УАЛИЕВА¹, Г.Ж. АБДИЕВА¹, Е.К. ОНГАРБАЕВ^{1,2},
А.С. НҰРМАҒАНБЕТОВА¹

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

² Жану проблемалары институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: bmakhatayeva@mail.ru

МҰНАЙТОТЫҚТЫРУШЫ БАКТЕРИЯЛАР НЕГІЗІНДЕГІ БИОСОРБЕНТТІҢ ДЕСТРУКТИВТІ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

doi:10.53729/MV-AS.2023. 04.15

Түйін

Мұнай тотықтырушы микроорганизм штамдарының мұнаймен ластанған аймақта өсу белсенділігі және мұнайды ыдырату белсенділігі зерттелді. Тәжірибе барысында таңдалып алынған микроорганизм штамдарынан микробтық консорциум құрастырылып көміртектендірілген шунгит және күріш қауыздарынан жасалған сорбенттерге иммобилизация жасалды. *Pseudomonas poae* TM1 және *Pseudomonas migulae* TM2 микроорганизмдер консорциумына және көміртектендірілген шунгит пен күріш қауызына негізделген биосорбент мұнаймен ластанған аймақтарды биоремедиациялауда перспективті екендігін көрсетті.

Кілтгі сөздер: сорбент, мұнай-тотықтырушы микроорганизмдер, консорциум, биосорбент.

Қазіргі таңда Қазақстан ірі мұнай өндіруші елдердің қатарына кіреді. Қазақстан үшін топырақтың мұнаймен және мұнай өнімдерімен ластануы үлкен мәселе болып табылады. Қоршаған ортаға теріс әсер ету бойынша мұнай өндіру отын-энергетика кешені салаларының арасында жетекші орындардың бірін алады, бұл мұнайдың елімізде кең көлемінде өндірілуіне және тұтылуына байланысты. Оның қоршаған ортаға төгілуі көптеген организмдердің тіршілігінің жойылуына, экожүйенің өзгеруі мен деградациясына әкеліп соғады. Қазіргі кезде мұнай және мұнай өнімдерімен күресу жолында микробиологиялық әдістер қолданылады. Химиялық заттарды детоксикациялау процесінде топырақ микроорганизмдері үлкен рөл атқарады. Микроорганизмдердің мұнайды ыдырату қабілеті олар жүргізетін биохимиялық реакциялардың көптігімен және олардың

бейімделуінің жоғары деңгейімен байланысты. Мұнай мен мұнай өнімдерімен ластану топыраққа өте жағымсыз әсер етеді, жердің сапасы мен өнімділігін төмендетеді. Ластанған топырақ өсімдіктерге, жануарларға және адамдарға улы болады және кейбір жағдайларда ауыр улану мен өлімге әкелуі мүмкін.

Тау-кен өндірісі орын алатын кен орындарындағы апаттармен байланысты экологиялық апаттардың нәтижесінде топырақ тесіктері бітеліп, оны гидрофобты етеді және әдетте суды сақтау қабілетінің төмендеуіне әкеледі. Мұнай мен мұнай өнімдерінің төгілуі көмірсутектерді тікелей өндіру, тасымалдау, өңдеу және пайдалану арқылы мүмкін болады. Қоршаған ортаға енген кезде мұнай немесе мұнай өнімдері экожүйеге теріс әсер етеді, сонымен бірге топырақтың рН деңгейі мен аэрация дәрежесін айтарлықтай өзгертеді [1].

Қоршаған ортаны мұнаймен ластанудан қорғау мақсатында қабылданатын шаралардың ішінде ең перспективті және экологиялық қауіпсіз әдістердің бірі кейбір микроорганизмдердің мұнай мен мұнай өнімдерін жою қабілетіне негізделген топырақты биоремедиациялау әдісі болып табылады. Микроорганизмдердің мұнай көмірсутектерін түрлендіру немесе ыдырату қабілеті белгілі және оларды ластанған аумақтарды биоремедиациялау үшін пайдалануға мүмкіндік береді [2].

Биоремедиация - мұнаймен ластанған топырақты тазартудың ең перспективалы әдістерінің бірі. Ол микроорганизмдер мен басқа тірі организмдердің әртүрлі көмірсутектерді ыдырату және жою қабілетіне негізделген. Табиғи ортада қалдықтар болмайды және биодеградация үздіксіз және барлық жерде жүреді; кез келген органикалық заттар микроорганизмдердің бүкіл кешенін қоректік заттармен қамтамасыз ете алады және ақырында көмірқышқыл газы мен су түзу үшін органикалық заттарды минералдандырады.

Кейбір минералды және өсімдік материалдары бар көміртекті материалдар мен композиттер микробтық клеткаларды тасымалдаушы ретінде пайдалануда перспективті екені мәлім. Мұндай тасымалдаушы сорбенттер жоғары химиялық төзімділікке, механикалық беріктікке, ион алмасу қасиеттеріне, суға және басқа субстраттарға жеткілікті өткізгіштікке, биоүйлесімділікке және өңдеуге қабілетті [1].

Негізгі тасымалдаушы сорбенттердің айрықша қасиеттері-олар ауыл шаруашылығы мен ағаш өңдеудің өсімдік қалдықтарының арзан және қол жетімді пиролиз өнімдерінен, сондай-ақ микроэлементтермен байытылған цеолиттерден және табиғи алюмосиликаттар мен оксидтердің кейбір басқа мысалдарынан жасалған. Иммобилизацияланған микроорганизмдер бос клеткалармен қатар бірнеше артықшылықтарға ие, сондықтан ластанған экожүйелерді тазартуда иммобилизацияланған микроорганизм клеткаларын қолдану арқылы биоремедиацияның жоғары тиімділігіне қол жеткізуге болады [3].

Биологиялық өнімдердің тиімділігін арттыруға әртүрлі тасымалдаушыларда иммобилизацияланған деструктор клеткаларды қолдану арқылы қол жеткізуге болады. Себебі клеткалардың қатты беттерге жабысуы микробтық клеткалардың әсер ету аймағында жоғары концентрациясын қамтамасыз етеді, олардың шайылып кетуіне жол бермейді, улы мұнай компоненттерінің жоғары концентрациясының әсерінен қорғайды және микрофлораның ерекше деструктивті белсенділігін арттыруға мүмкіндік береді [4].

Бұл мақаланың мақсаты *Pseudomonas poae* TM1 және *Pseudomonas migulae* TM2 микроорганизмдер консорциумына және көміртектендірілген шунгит пен күріш қауызына негізделген биосорбент пен көміртектендірілген шунгит пен күріш қауызына негізделген сорбенттің мұнаймен ластанған аймақтарды биоремедиациялау қабілетін салыстырмалы түрде зерттеу болып табылады.

Материалдар мен әдістер

Микроорганизмдердің әртүрлі топтарының санын анықтау

Ластаушыға төзімді физиологиялық топтарды анықтау үшін топырақ микроорганизмдерінің әртүрлі топтарының санын анықтау және қоймаларға іргелес жерлерде топырақ микрофлорасының микробиологиялық құрамын салыстыру тығыз

коректік орталарда топырақ суспензиясын дәйекті сұйылту әдісімен жүргізілді. Клеткалардың санын анықтау Кох әдісімен жүргізілді. Әдістің мәні микроорганизмдердің зерттелетін суспензиясының белгілі бір көлемін Петри табақшаларына тығыз ортаға себу және инкубациядан кейін өскен колонияларды санау болып табылады. Егіс агарлы ортада Петри табақшаларында жүзеге асырылады. Микроорганизмдердің жалпы санын анықтау үшін ет-пептон агары (ЕПА), топырақтағы саңырауқұлақтардың құрамын анықтау үшін-суло-агар (СА), микроорганизмдердің әртүрлі физиологиялық топтарының санын анықтау үшін тиісті коректік орталар қолданылады. Зеңдер Чапек–Докстың агарлы ортасында, аммонизациялаушы бактериялар ГРМ-агарында, азотты бекітетін бактериялар – Эшби ортасында, аэробты целлюлозолитикалық бактериялар Хетчинсон мен Клейтонның тығыз өсетін ортасында саналды.

Дақылдарды өсіру термостатта 28-30°C температурада гетеротрофты бактерияларды бөліп алу үшін 2 күн, актиномицеттер, азотты бекітетін және зең саңырауқұлақтары 5-7 күн және целлюлозолитикалық бактериялар 7-9 күн ішінде бөлініп алынды. Егін инкубациясынан кейін өскен колониялардың сандық есебі жүргізіліп, 1 г топырақтағы колония түзетін бірліктердің (КТБ) саны анықталды.

Топырақ үлгілерінен таза дақылдарды оқшаулау әдістері

Таза дақылдарды алу тығыз коректік ортаның бетіндегі механикалық бөліну арқылы жүзеге асырылды (ілмекті күйдіру әдісі) [5]. Жеке колониялар микроскопия арқылы тазалыққа тексеріліп, өсіру үшін қиғаш коректік агарға себілді.

Бөлініп алынған микроорганизмдердің морфологиялық-культуралды, физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу әдістері

Бактериялардың морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық белгілерін зерттеу жалпы қабылданған әдістерге сәйкес жүргізілді. Бөлінген микроорганизмдердің таза дақылдарының морфологиялық және культуралды қасиеттері келесі белгілер бойынша зерттелді: клеткалардың пішіні мен орналасуы, клеткалардың мөлшері, клеткалардың қозғалғыштығы, эндоспоралардың болуы, Грам бойынша боялуы, қатты коректік ортадағы колонияның сипаттамасы, сұйық коректік ортадағы өсу үлгісі, қиғаш агардағы өсу үлгісі. Бактериялар мен ашытқылардың физиологиялық-биохимиялық қасиеттері келесі белгілермен анықталды: 42°C кезінде бактериялардың көбеюі, желатин, крахмал, казеин гидролизі, каталазаның болуы және молекулалық азотты қолдану, әртүрлі көмірсулар мен спирттердің ашытуы [6].

Иммобилизацияланған микроорганизм клеткаларына негізделген биодеструкторларды алу

Сорбциялық клетка иммобилизациясы келесідей жүргізілді:

NaCl изотоникалық ерітіндісіндегі 100 мл клеткалық суспензия тасымалдаушылардың қатысуымен 100 мл ортаға 1 г мөлшерінде, Эрленмейер колбасында бөлме температурасында 48 сағат бойы инкубацияланды, зертханалық шейкерде 220 айн/мин шайқалды. Содан кейін иммобилизацияланған клеткалары бар тасымалдаушы әлсіз бекітілген клеткалардан изотоникалық ерітіндімен жуылды және десорбцияланған клеткалардың саны анықталды.

Клеткалардың сорбциясы мен десорбциясын анықтау әдістері:

Клеткалардың сорбциясы мен десорбция дәрежесін бағалау үшін ерітіндідегі клетка концентрациясын КФК - 2МПА фотоколориметрінің көмегімен оптикалық жолдың ұзындығы 1 см, толқын ұзындығы 540 нм болатын стандартты кюветтерде, «өткір» тәжірибелерде суспензияның оптикалық тығыздығы бойынша өлшеу жүргізілді [7].

Клеткалар саны мен оптикалық тығыздық арасындағы байланысты анықтау үшін калибрлеу қисығы салынды.

Бекітілген клеткалардың саны сынамалардың оптикалық тығыздығының бастапқы және соңғы мәндерінің айырмашылығына байланысты есептелді. Адсорбцияланған клеткалардың үлесі Никовская әдісімен анықталды:

$$\% = 100 \times \frac{D_{\text{тәж}}}{D_{\text{бас}}} \quad (1)$$

мұндағы, $D_{\text{бас}}$ – бастапқы суспензияның оптикалық тығыздығы
 $D_{\text{тәж}}$ – тәжірибелік сынамалардың оптикалық тығыздығы

Сокслет арқылы топырақтан мұнайды тазарту. Дайындалған топырақ ілмегі 10,00 г дайындалған жеңге салынып, 8 сағат ішінде 70 мл хлороформ қосу арқылы Сокслет аппаратында алынды. Экстракциядан кейін сығындының көлемі өлшеуіш цилиндрмен өлшенді. Барлық талдаулар екі параллельде жүргізілді [8].

Егу материалдарын дайындау. Мұнай деструкторларынан тұратын консорциумның биомассасын алу үшін микроорганизмдер аэрация кезінде және 28°C температурада 2 тәулік бойы термошейкерде (220/мин) клетка титрімен 10⁹ КТБ/мл сұйық оңтайлы ортада жеке өсірілді. Инокулят егу ортасынан оптималды қоректік ортаға ауыстырылды. Ол үшін 500 мл колбаларға 100 мл қоректік орта енгізілді. Штамдар 28°C температурада 10¹⁰⁻¹² КТБ/мл клетка титріне дейін 2 күн бойы өсірілді. 48 сағаттан кейін микроорганизмдер клеткаларының жалпы саны анықталды. Биомассаны қажетті мөлшерде алу үшін клеткалық суспензия INOBIO-5BG ферменттеріне ауыстырылды.

Нәтижелер және оларды талқылау

Мұнаймен ластанған топырақтарға биоремедиация жүргізу үшін деструктор-штамдар қауымдастығының биомассасын алу

Биоремедиация технологиялары жоғары тиімділігіне, төмен құнына және өнімдердің (негізінен CO₂ және су) зиянсыздығына байланысты физикалық және химиялық қалпына келтіру әдістерімен салыстырғанда кеңірек қолданылуға [9]. Биоремедиацияның маңызды факторлары микроорганизмдердің мөлшері мен белсенділігі, топырақтың қоректік заттары және оттегі күйі болып табылады. Дегенмен, мұнаймен ластанған топырақта әдетте микробтардың саны аз, кеуектілігі төмен және қоректік заттар бар, бұл практикалық қолдану кезінде микроорганизмдердің ыдырау тиімділігін шектейді [10-12].

Табиғи объектілерді мұнайдың ластануынан табиғи түрде тазарту ұзақ процесс болып табылады, сондықтан мұнаймен ластанған топырақты қалпына келтіру проблемасы, атап айтқанда биоремедиация ерекше өзектілікке ие болады. Мұнаймен ластанған топырақты тазартудың перспективті технологиясы топыраққа мұнай мен мұнай өнімдерінің белгілі бір көмірсутек компоненттерін биодеструкциялау қабілетінің жоғарылауымен ерекшеленетін микроорганизмдердің әртүрлі кешендерін енгізу болып саналады [13].

Осыған байланысты күрделі ластану жағдайында, осы заттардың биодеструкторларына қабілетті көмірсутектері жоғары ортада өсуге және белсенді биохимиялық белсенділікті көрсетуге қабілетті деструкторлық микроорганизмдерді қолдану мүмкіндігі өзекті болып табылады.

Ксенобиотиктердің тиімді трансформациясының маңызды шарты деструкторлық организмдер арасында антагонизмнің болмауы болып табылады. Микроорганизмдер органикалық ластаушы заттарды көміртектің жалғыз көзі ретінде пайдалана алады, бұл олардың топырақтағы органикалық ластаушы заттарды ыдыратуға мүмкіндік береді [14].

Жұмыс барысында биомасса алу үшін INOBIO-5BG ферменттері қолданылды (Сурет 1). Бактериялық штамдар оптималды сұйық ортада 48 сағат бойы өсірілді, ортаның рН бейтарап мәнге ие. Эксперимент барысында мұнай деструкторларының өміршең клеткаларының саны анықталды. Культуралық суспензиядағы колония түзуші бірліктердің (КТБ) санын анықтау үшін стандартты сериялық сұйылту әдісі қолданылды.



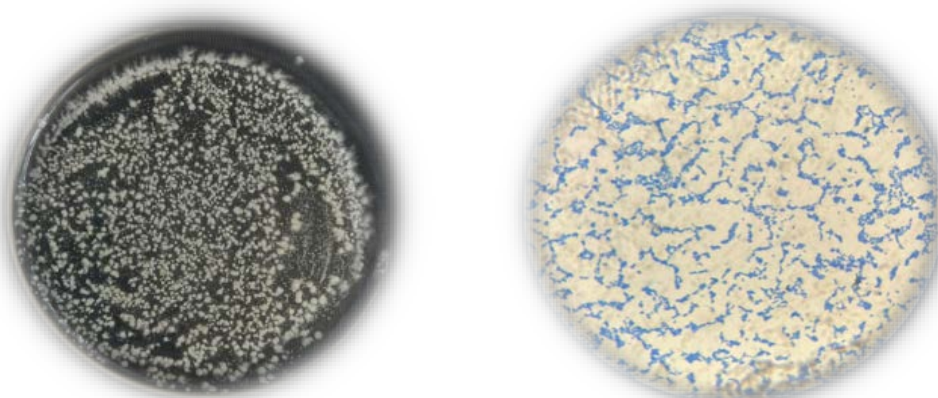
а) 1 тәулік



б) 2 тәулік

Сурет 1 - Штамм-деструкторларды INOBIO-5BG ферментерінде өсіру

1-суретте ферментерде 1-ші күні қоректік орта мөлдір, 2-ші күні дақылдардың белсенді өсуі байқалады және қоршаған ортаның бұлыңғырлығы байқалды. Сондай-ақ, өсіру кезінде культуралық сұйықтықтағы микроорганизмдердің өміршең клеткаларының саны 24 сағат және 48 сағаттан кейін анықталды (Сурет 2).



Сурет 2 - Ферментерде өсірілген мұнай тотықтырғыш бактериялардың макро және микроморфологиясы

2-суреттен көрініп тұрғандай, мұнай тотықтырғыш бактериялардың культуралары таза, микроскопия кезінде морфологиясы бойынша ұқсас клеткалар анықталды. Біртекті колониялар және колония түзуші бірліктердің саны $2,5 \times 10^{10}$ КТБ/мл құрады.

Нақты мұнаймен ластанған топырақты тазарту үшін жасалған сорбенттерді сынау

Мұнай көмірсутектерімен ластанған аумақты биоремедиациялау технологияларын әзірлеу және жетілдіру қазіргі уақытта белсенді іргелі және қолданбалы зерттеулер саласы болып табылады. Шикі мұнай – жүздеген компоненттері бар химиялық заттардың қоспасы. Әр түрлі географиялық аймақтарда өндірілген мұнайдың негізгі айырмашылығы химиялық

құрамға емес, жеке компоненттің құрамына байланысты; соңғысы шикі мұнайдың химиялық және физикалық қасиеттеріне әсер етеді. Сондықтан соңғы кездері биоремедиацияда екі немесе одан да көп штамдардан тұратын микробтық ассоциациялар қолданылады, өйткені көмірсутекті тотықтырғыш микроорганизмдердің монокультурасын мұнай-тотықсыздандырылған ортаға енгізу тазарту мәселесін толығымен шеше алмайды [15].

Жұмыс барысында көміртектендірілген шунгит пен күріш қабығына негізделген сорбенттің және микроорганизмдерге негізделген биосорбенттің деструктивті белсенділігі далалық жағдайларда зерттелді. Тәжірибе нәтижелері көрсеткендей, мұнайдың деградациясын арттыру үшін бірнеше микроорганизмдерден тұратын аралас культураларды қолдану және оларды тасымалдаушыларға иммобилизациялау әдістері тиімді деуге болады.

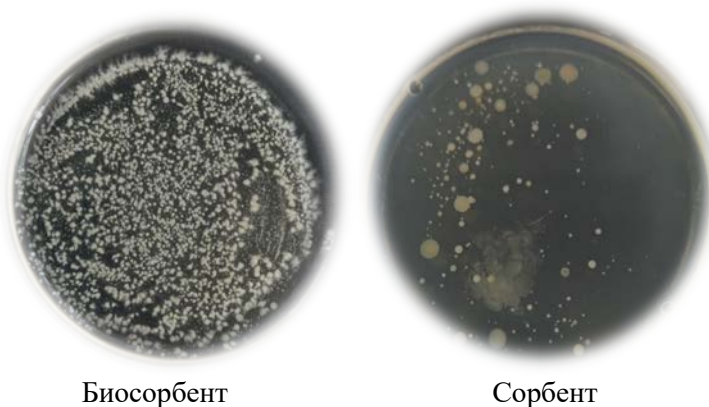
Жұмыста мұнай тотықтырушы микроорганизмдер бір-бірімен үйлесімділік принципі бойынша жаңа консорциумға біріктірілді. Бұл консорциумдарда *Pseudomonas roae* ТМ1 және *Pseudomonas migulae* ТМ 2 деструктивті штамдары қолданылады.

Тәжірибелердің басында Баянды кентінің маңындағы қалдықтар полигонының мұнаймен ластанған топырағы дайындалды. Полигон Ақтау қаласынан 35 км қашықтықта орналасқан. Полигон мұнай өндірумен және өңдеумен айналысатын мұнай кен орындарынан әкелінген мұнай қалдықтарын сақтауға арналған. Өсімдіктер аз, жусан мен құмдық еркекшөппен ұсынылған. Климаты орташа құрғақ, желдің жылдамдығы 0,7 м/с, тазарту шараларын жүргізу кезеңіндегі ауа температурасы 32°C-тан 35°C-қа дейін болды. эксперименттердің басында учаскелер дайындалды, учаскенің ауданы (3x3,5) 10,5 м². Келесі қадам көміртектендірілген шунгит пен күріш қабығына негізделген сорбентті (1:1,7) және биосорбентті; мұнай тотықтырушы микроорганизмдер штамдарын мұнаймен ластанған топыраққа енгізу болды. Сорбент пен мұнай деструкторларына негізделген биосорбентті қолданғаннан кейін топырақ ылғалдандырылып, қопсытылды. Топырақтағы микроорганизмдерді есепке алу үшін микробиологияда қолданылатын жалпы қабылданған әдістер қолданылды.



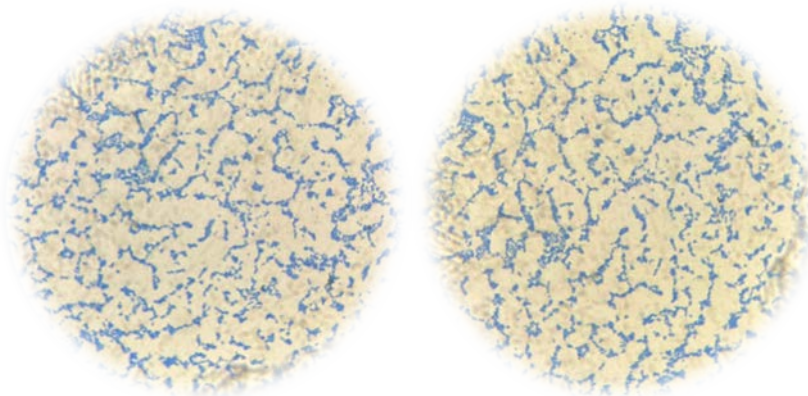
Сурет 3 - Баянды кентінің жанындағы полигонның мұнаймен ластанған топырағы

3-суретте полигонның топырағын көзбен майлы екендігін және де мұнай өнімдерінің өткір иісі бар екенін көруге болады. Мұнай көмірсутектерімен ластанудың бастапқы деңгейі 158,2 г/кг топырақты құрады. 10, 30, 60 тәуліктен кейін микроорганизмдердің тіршілік ету деңгейін анықтау және олардың санын анықтау үшін эксперименттік учаскеден топырақ сынамалары алынды. Сондай-ақ, топырақты мұнайдан тазарту дәрежесі анықталды.



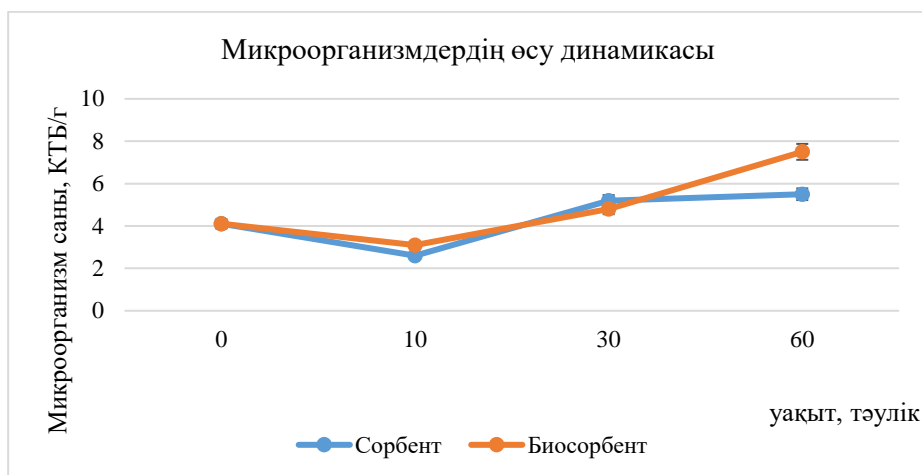
Сурет 4 - Полигонның мұнаймен ластанған топырағының микробтық алуантүрлілігі

Деструкторлар негізіндегі биосорбент және сорбент енгізе отырып 10-шы, 30-шы және 60-шы күні, мұнаймен ластанған топырақта енгізілген штамдарға ұқсас морфологиялық колониялар анықталды. Топыраққа енгізілген кезде мұнай тотықтырғыш бактериялардың клеткалары эксперимент кезінде өміршеңдігін сақтағаны анықталды (3-4-сурет).



Сурет 5 - Сорбентте иммобилизацияланған штамм-деструкторлардың морфологиясы

Микроскопия кезінде таяқша тәрізді, ұсақ клеткалар анықталды, морфологиялық белгілері бойынша псевдомоналарға тән. Әрі қарай жұмыста полигонның эксперименттік учаскесінен мұнаймен ластанған топырақтағы микроорганизмдердің саны зерттелді (1-кесте).

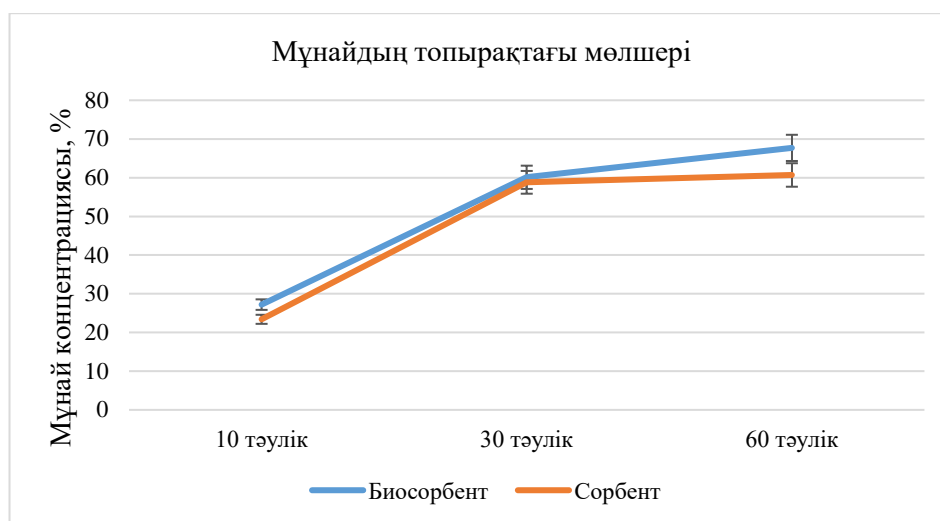


Сурет 6 - Полигонның эксперименттік учаскесінің мұнаймен ластанған топырағындағы микроорганизмдердің саны

Суреттен көріп отырғанымыздай, бақылау топырағының үлгілеріндегі микроорганизмдердің саны $4,1 \times 10^6$ КТБ/г құрады. Полигонның эксперименттік учаскесінің мұнаймен ластанған топырағында 10-шы тәулікке микроорганизмдердің колониялық түзуші бірліктерінің саны биосорбент енгізілген нұсқада $3,1 \times 10^{10}$ КТБ/г, сорбент енгізілген нұсқада $2,6 \times 10^9$ КТБ/г құрады.

Мұнай және мұнай өнімдерімен ластанған топырақтардағы далалық эксперименттің 30 және 60-шы күндерінде микроорганизмдер санның өсу тенденциясын көрсетеді және олардың өміршеңдігі сақталады. Сонымен, биосорбент енгізілген топырақтарда 60-шы күні микроорганизмдердің саны $7,5 \times 10^{11}$ КТБ/г-ға жетті және сорбент $5,5 \times 10^{10}$ КТБ/г-ға жетті. Микроорганизмдер санын анықтаған кезде өміршең клеткалардың титрі эксперименттің басында топыраққа культура енгізуге қарағанда әлдеқайда төмен болады. Бұл мұнай деструкторшы клеткаларының өміршеңдігі мен сандық көрсеткіштерін сақтайтындығын көрсетеді, өйткені олар үшін мұнай мен мұнай өнімдері көміртектің жалғыз көзі болып табылады. Мұнай мен мұнай өнімдерін жоюға қабілетті микроорганизмдердің әртүрлілігі жоғары бәсекелестікке және олардың әртүрлі фракцияларының деградациясының көптеген жолдарына байланысты. Микроорганизмдер әртүрлі көмірсутектерге селективті қатынас қасиетіне ие.

Жұмыста шунгит пен күріш қабығына негізделген сорбентті және мұнай деструкторларына негізделген биосорбентті қолдана отырып, эксперименттік учаскедегі мұнай мен мұнай өнімдерінен топырақты тазарту дәрежесі зерттелді. Топырақтағы мұнай өнімдерінің құрамы Сокслет аппаратындағы ыстық гексанмен топырақ суспензиясынан көмірсутектерді алып тастағаннан кейін салмақ әдісімен анықталды. 6-суретте сорбент пен биосорбентті енгізе отырып, тазартудан кейін мұнаймен ластанған топырақтағы мұнай мөлшері туралы мәліметтер келтірілген.



Сурет 6 - Тазартудан кейін мұнаймен ластанған топырақтағы мұнайдың мөлшері

Сорбент пен биосорбентті полигонның мұнаймен ластанған топырағына енгізгеннен кейін 10, 30 және 60 тәулікте топырақ үлгілері алынды. Биосорбент енгізілген топырақ үлгілерінде 10 тәулікте мұнайдың деградациясы 27,2%, 30 тәулікте 60,1%, 60 тәулікте 67,7% болды. Сорбент енгізілген үлгілерде 10 тәулікте мұнайдың деградациясы 23,4%, 30 тәулікте 58,8%, 60 тәулікте 60,7% болды. Осылайша, жұмыс нәтижесінде полигонның мұнаймен ластанған топырағындағы мұнай мөлшері 23,4% - дан 67,7% - ға дейін төмендеді.

Қорытынды

Жалпы, нақты мұнаймен ластанған топырақтарда жүргізілген далалық сынақтар иммобилизацияланған дақылдарға негізделген деструктивті штаммдар консорциумының және көміртектендірілген күріш қабығы және шунгит негізіндегі сорбенттің мұнайдың

көмірсутектерін тиімді жоюын көрсетті. Биосорбенттің деструктивті белсенділігін далалық эксперименттерде зерттеу нәтижелері полигонның мұнаймен ластанған сорбент және биосорбент қосылған топырағындағы мұнай мөлшері сәйкесінше 60,7% және 67,7%-ға дейін төмендеді. Жүргізілген алдын ала ғылыми зерттеулердің нәтижелері мұнай және мұнай қалдықтарды тазарту бойынша технологияны әзірлеуге мүмкіндік береді. Алынған нәтижелер қоршаған ортаның құрамында мұнай бар объектілерді тазарту үшін практикалық маңызға ие.

Қаржыландыру

Жұмыс ҚР БҒМ қаржыландырған АР08856559 «Разработка сорбентов на основе шунгитовых пород для очистки нефтезагрязненных почв» жобасы аясында жасалды.

Әдебиеттер:

1 Elizaveta, M., & Maria, U. Ecological aspects of sorbents use to improve the efficiency of bioremediation on oil-contaminated lands. *Revista Fuentes, el reventón energético*, 2021, 19(1): 65-73. (doi: <https://doi.org/10.18273/revfue.v19n1-2021006>)

2 Бабаев Э.Р. Микробиологическая деструкция нефти в почвах Апшеронского полуострова. *Территория нефтегаз*, 2017, 11: 64-69. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiologicheskaya-destruktsiya-nefti-v-pochvah-apsheronского-poluostrova>)

3 Gaur N., Narasimhulu, K., & PydiSetty, Y. Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of cleaner production*, 2018, 198: 1602-1631 (doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.076)

4 Казанкапова М. К. *Создание модифицированных углеродминеральных сорбентов для очистки природных объектов от техногенных загрязнений. Докт. дис.* Алматы, 2013. (URL: <https://studylib.ru/doc/2096334/dissertacionnaya-rabota-kazankapovoj-m?ysclid=106qj51xbp396403342>)

5 Нетрусов А. И. *Большой практикум по микробиологии.* М., 2005.

6 Игнатова Л.В. *Основы микробиологии.* Қазақ Универ-ті, 2009.

7 Никовская.Г.Н. Адгезионная иммобилизация микроорганизмов в очистке воды. *Химия и технология воды*, 1989, 11(2): 158-169.

8 Другов Ю.С., Родин А.А. *Анализ загрязненной почвы и опасных отходов.* М., 2007.

9 Ebadi A, Khoshkholgh Sima NA, Olamaee M, Hashemi M, Ghorbani Nasrabadi R. Remediation of saline soils contaminated with crude oil using the halophyte *Salicornia persica* in conjunction with hydrocarbon-degrading bacteria. *J Environ Manage*, 2018, 1(219): 260-268. (doi: 10.1016/j.jenvman.2018.04.115)

10 D. Borah and R. N. S. Yadav, Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain Egypt. *J. Pet.*, 2017, 26: 181–188 (doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.02.005>)

11 H. Cui, X. Yang, L. Xu, Y. Fan, Q. Yi, R. Li and J. Zhou, Effects of goethite on the fractions of Cu, Cd, Pb, P and soil enzyme activity with hydroxyapatite in heavy metal-contaminated soil. *RSC Adv.*, 2017, 7: 45869–45877 (doi: <https://doi.org/10.1039/C7RA08786A>)

12 H. Su, S. Mi, X. Peng and Y. Han, The mutual influence between corrosion and the surrounding soil microbial communities of buried petroleum pipelines. *RSC Adv.*, 2019, 9: 18930–18940. (doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA03386F>)

13 Кураков А.В., Ильинский В.В., Котолевцев С.В., Садчиков А.П. *Биоиндикация и реабилитация экосистем при почвенных загрязнениях.* М., 2006. (URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-mikrobnoy-transformatsii-azota-i-ugleroda-v-usloviyah-neftyanogo-i-radioaktivnogo-zagryazneniya>)

14 Velacano, M. Castellano, Hinojosa, A. Vivas, A.F. Toledo, M.V.M. Effect of Heavy Metals on the Growth of Bacteria Isolated from Sewage Sludge Compost Tea. *Adv. Microbiol.*, 2014, 4: 644–655. (doi: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.410070>)

15 И.А. Пырченкова, А.Б. Гафаров, И.Ф. Пунтус. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти. *Прикл. биохим. микробиол.*, 2006, 42(3): 298-305. (URL: <https://www.dissercat.com/content/ekologo-funktsionalnye-aspekty-mikrobnoi-remediatsii-neftezagryaznennykh-pochv>)

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Оплата за публикацию статьи – 30 000 тенге.

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 5);
- 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 15 машинописных страниц (статьи обзорного характера – до 30 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



0 4



9

772304 585132