



ISSN 2304-585X  
ИНДЕКС 76057

2022

# Microbiology and virology

# МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ



# ВИРУСОЛОГИЯ

№1(36)



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

# **МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ**

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

**№ 1(36)**

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ  
2022

ISSN 2304–585 X  
**МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ**  
 № 1(36)/2022

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

**УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ**

© ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

**Редакционная коллегия**

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

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

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

Dr. Azliati Azizan (USA) – PhD

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

Богоявленский А.П. – доктор биологических наук, профессор

Гаврилова Н.Н. – доктор биологических наук, профессор

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

Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук

Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук

Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана

Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор

Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент

Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор

Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD

Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор

Саятов М.Х. – доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК

Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

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

E-mail: [imv-jurnal.kz@list.ru](mailto:imv-jurnal.kz@list.ru)

Сайт: <http://imv-journal.kz>

Подписной индекс - 76057

ПЕЧАТЬ

ТОО «Print Market.kz»

Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125

Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68

Территория распространения – Республика Казахстан

Периодичность – 4 номера в год

Тираж 500 экземпляров

**МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ**

**СОДЕРЖАНИЕ**

**ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ**

Н.Г.Кливлеева, М.Г.Шаменова, Т.И. Глебова, Н.Т. Сактаганов  
 Циркуляция вируса гриппа А в популяции кошек и собак.....4

А.Х.Хасенова, Е.С. Молдаханов, С.Д.Жантлесова, А.Д. Масирбаева, М. Елубаева  
 Эндофитные актиномицеты - перспективный источник природных антибиотиков.....29

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ**

Г.Т. Джакибаева, О.Н. Шемшура, Д.А. Тлеубекова  
 Оценка жизнеспособности и биологической активности хлебопекарных и винных дрожжей после длительного хранения.....44

Э.Т. Исмаилова, А.К.Саданов, О.Н. Шемшура, А.И. Байдалинов, Д.А.Тлеубекова, Г.Б. Баймаханова, Г.А.Жармухамедова, Ж.К.Жуманова  
 Фитосанитарный мониторинг дикоплодовых насаждений яблони сиверса на пораженность болезнями в условиях южного, юго-восточного и центрального казахстана.....57

А.В. Чижаева, А.А. Амангелді, А.Ж. Алыбаева, Е.А. Олейникова, И.Ю. Потороко  
 Исследование протеолитической и экзополисахарид-продуцирующей активности молочнокислых и пропионовокислых бактерий, перспективных для применения в аквакультуре.....81

Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай, А.В. Кердяшкин, А.Ж. Алыбаева, А.А. Амангелді, А.В. Чижаева, М.Г. Саубенова, Г.В. Кердяшкина, М.Е. Елубаева  
 Эндофитные микроорганизмы, повышающие устойчивость пшеницы к засухе.....96

З.А. Латыпова, Л.С. Аубекерова, Ш.Т. Сарбаканова, Р.А. Керимбаева, Е.Б. Шакибаев  
 Характеристика *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса разных видов животных.....113

И.Э.Смирнова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.Б. Баймаханова, Г.А. Спанкулова  
 Влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян и развитие растений донника и люцерны.....124



## МАЗМҰНЫ

## CONTENTS

## ШОЛЫМА МАҚАЛАЛАР

Н.Г. Кливлеева, М.Г. Шаменова, Т.И. Глебова,  
Н.Т. Сактаганов

Мысықтар мен иттер популяциясындағы А  
тұмауы вирусының айналымы.....16

А.Х. Хасенова, Е.С. Молдаханов, А. С.  
Джантлесов, А.Д. Мәсирбаева, М.Е. Елубаева

Эндофитті актиномицеттер-табиғи  
антибиотиктердің перспективті көзі.....36

## БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

Г.Т. Джакибаева, О.Н.Шемшура, Д.А.Тлеубекова  
Ұзақ уақыт сақтағаннан кейін наубайханалық  
және шарап ашытқыларының өміршеңдігі мен  
биологиялық белсенділігін бағалау.....51

Э.Т. Исмаилова, А.К. Саданов, О.Н. Шемшура,  
А.И. Байдалинов, Д.А.Тлеубекова,  
Г.Б. Баймаханова, Г.А. Жармухамедова, Ж.К.  
Жуманова

Оңтүстік, оңтүстік-шығыс және орталық  
қазақстан жағдайындағы сиверс алма жабай  
жеміс өсімдерінің ауруларына фитосанитарлық  
мониторинг.....69

А.В. Чижаева, А.А. Амангелді, А.Ж. Алыбаева,  
Е.А. Олейникова, И. Ю. Потороко

Аквакультурада қолдану үшін перспективалы сүт  
қышқылы мен пропион қышқылы  
бактерияларының протеолитикалық және  
экзополисахарид-өндіруші белсенділігін  
зерттеу.....88

Е.А. Олейникова, Ж.Н. Ермекбай,  
А.В. Кердяшкин, А.Ж. Алыбаева, А.А. Амангелді,  
А.В. Чижаева, М.Г. Саубенова, Г.В. Кердяшкина,  
М.Е. Елубаева

Бидайдың құрғақшылыққа төзімділігін  
арттыратын эндофитті  
микроорганизмдер.....105

З.А. Латыпова, Л.С. Аубекерова,  
Ш.Т. Сарбақанова, Р.А. Керимбаева,  
Е.Б. Шакибаев

Әр түрлі жануарлардың етінен бөлінген *Listeria*  
*monocytogenes*-тің сипаттамасы, алматы.....118

И.Э. Смирнова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина,  
Г.Б. Баймаханова, Г.А. Спанкулова

Целлюлолитикалық бактериялардың  
тұқымдардың өсуіне және түйежоңышқа мен  
жоңышқа өсімдіктерінің дамуына әсері.....128

## REVIEW RESEARCH PAPERS

N.G. Klivleyeva, M.G. Shamenova, T.I. Glebova,  
N.T. Saktaganov

Circulation of influenza A viruses in canine and  
feline populations.....17

A.K. Khassenova, E.S. Moldakhanov, S.D.  
Zhantlessova, A.D. Masirbaeva, M.Y. Yelubayeva

Endophytic actinomycetes: promising source of  
natural antibiotics .....37

## ORIGINAL RESEARCH PAPERS

G.T.Dzhakibaeva, O.N.Shemshura, D.A.Tleubekova  
Evaluation of viability and biological activity of  
bakery and wine yeast after long-term  
preservation.....51

E.T. Ismailova, A.K. Sadanov, O.N. Shemshura,  
A.I.Baidalinov, D.A.Tleubekova,  
G.B. Baimakhanova, G.A. Zharmukhamedova,  
ZH.K. Zhumanova

Phytosanitary monitoring of sievers apple wild-fruit  
plants for disease affect in the conditions of southern,  
south-eastern and central Kazakhstan.....69

A.V. Chizhayeva, A.A. Amangeldi,  
A.Zh. Alybayeva, Ye. A. Oleinikova, I.Y. Potoroko

Investigation of the proteolytic and  
exopolysaccharide-producing activity of lactic acid  
bacteria and propionic acid bacteria promising for use  
in aquaculture.....89

Ye.A. Oleinikova, Zh.N. Yermekbay,  
A.V. Kerdyashkin, A.Zh. Alybayeva,  
A.A. Amangeldi, A.V. Chizhayeva, M.G. Saubanova,  
G.V. Kerdyashkina, M.Ye. Yelubayeva

Endophytic microorganisms increasing wheat  
resistance to drought.....105

Z.A. Latypova, L.S. Aubekerova,  
Sh.T. Sarbakanova, R.A. Kerimbayeva,  
E.B. Shakibaev

Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated  
from meat of different animal species,  
almaty.....119

I.E. Smirnova, E.R. Fayzulina, L.G. Tatarkina, G.B.  
Baimakhanova, G.A. Spankulova

Effect of cellulolytic bacteria on seed germination  
and development of sweet clover and alfalfa  
plants.....129

=====

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

=====

MPHTI: 34.25.29

Н.Г. КЛИВЛЕЕВА, М.Г. ШАМЕНОВА, Т.И.ГЛЕБОВА, Н.Т. САКТАГАНОВ  
ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,  
г. Алматы, Казахстан

**ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А В ПОПУЛЯЦИИ КОШЕК И СОБАК**

**doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.01**

**Аннотация**

Вирусы гриппа А являются важными патогенами, присутствующими во всем мире и угрожающими здоровью людей и животных. Экология и эпидемиология вирусов гриппа А очень сложны и появление новых зоонозных патогенов, постоянно развивающихся и преодолевающих межвидовой барьер, является одной из самых серьезных проблем для глобальной безопасности в области здравоохранения. Вирусы гриппа А характеризуются генетической и антигенной изменчивостью, возникающей за счет сочетания высокой скорости мутаций и сегментированного генома, обеспечивающего способность быстро изменяться и адаптироваться к новым хозяевам. Поэтому эта категория вирусов имеет разнообразный круг хозяев, включая большое количество видов птиц и млекопитающих. В течение последнего десятилетия значительное внимание уделялось инфекциям вируса гриппа у собак, поскольку два подтипа вируса гриппа H3N8 и H3N2 вызвали несколько вспышек в Соединенных Штатах и Южной Азии, став эндемичными. Хотя у кошек грипп меньше описан в литературе, эти животные по-прежнему оказываются восприимчивыми ко многим инфекциям птичьего гриппа. Несмотря на то, что эпидемии гриппа представляют угрозу для здоровья собак и кошек, риски для людей в значительной степени неизвестны. В данной статье рассматриваются самые последние данные об эпидемиологии вирусов гриппа А у собак и кошек, существующие доказательства способности адаптации этих видов к хозяину, внутривидовая передача и формирование новых линий гриппа А посредством геномной реассортации. Такое углубленное понимание предполагает необходимость усиления мониторинга и исследований для обеспечения оптимальной готовности к неизбежным вспышкам и пандемиям, а также наблюдения за ролью взаимодействия домашних животных и человека в свете концепции «Единое здоровье» [1] и потенциального появления новых зоонозных вирусов.

**Ключевые слова:** вирус, грипп, зооноз, собака, кошка, межвидовая передача, реассортация

Вирус гриппа имеет большое значение, поскольку представляет непосредственную угрозу для людей и животных. Среди четырех типов вируса гриппа (А, В, С и D) вирусы гриппа А (ВГА) являются наиболее важными с клинической точки зрения, вызывая тяжелые эпидемии среди людей и домашних животных. Дикие перелетные птицы и летучие мыши являются основными естественными резервуарами, от них вирус может переноситься на другие виды животных-хозяев, такие как утки, куры, лошади, свиньи, киты, кошки, собаки и т. д. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. ВГА обычно имеют ограниченный круг хозяев, но иногда передаются от одного вида другому [11, 12, 13]. Высокая частота мутаций в сочетании с высокой скоростью репликации и реассортации позволяет вирусу быстро адаптироваться к изменениям в окружающей среде. В конечном итоге это

может привести к созданию вируса, способного размножаться в организме человека и обладающего новыми антигенными свойствами, что может стать причиной вспышки пандемии. Примечательно, что серьезную угрозу для здоровья человека в первую очередь представляют домашние птицы и свиньи, поскольку исторически большинство человеческих пандемий возникали от птиц и свиней [14, 15]. В связи с тем, что в настоящее время в мире число владельцев кошек и собак увеличивается, а социальное поведение имеет тенденцию регистрировать эти виды животных в качестве членов семьи [16-18], изучение эпидемиологии ВГА у собак и кошек и путей их передачи остаются актуальной задачей.

#### Появление ВГА и последующее распространение среди собак и кошек

Большинство домашних животных содержатся в небольших количествах в жилых домах, и многие из них не имеют или имеют лишь кратковременные и нечастые контакты с другими представителями того же вида, поэтому передача гриппа неэффективна. Тем не менее, некоторые домашние собаки и кошки содержатся в плотных популяциях, таких как питомники или приюты для животных. В таких условиях контакты между собаками и кошками неизбежны, а при попадании вирусов гриппа в популяцию возможна устойчивая передача некоторых линий, что может привести к устойчивым вспышкам и эпидемическому или эпизоотическому потенциалу. Тесные контакты собак и кошек с людьми также могут быть причиной зоонозного потенциала вирусов гриппа и способствовать заражению собак или кошек вирусами гриппа человека.

В настоящее время грипп у кошек и собак вызывают пять подтипов ВГА, описанных в литературе. Это варианты лошадиного и птичьего ВГА H3N8 [19, 20, 21] и H3N2 [22, 23, 24], низкопатогенный вирус птичьего гриппа (НВПГ) H7N2, высокопатогенный вирус птичьего гриппа (ВВПГ) H5N1, а также пандемический вирус H1N1 [25, 26], продолжающий циркулировать в настоящее время как вирус сезонного гриппа среди людей. Имеются сообщения о циркулирующих среди кошек и собак с признаками респираторной инфекции других подтипов, таких как H5N6, H5N2, H3N1, H9N2 и H10N8 [27, 28, 29, 30, 31]. В основном это вирусы гриппа птичьего происхождения или генетические реассортанты, образованные после ко-инфекции различными птичьими, свиными и человеческими ВГА. Сообщения о заражении кошек и собак человеческим вариантом ВГА сезонных типов были опубликованы, но в гораздо меньшей степени [32].

Вирус гриппа собак (ВГС) подтипа H3N8 впервые зарегистрирован в 2004 г. во время вспышки тяжелого респираторного заболевания у гончих борзых, однако имеются серологические доказательства появления ВГС-H3N8 в 1999 г. [11, 23, 33]. С тех пор вирус считается эндемичным для собачьей популяции в США, поражающим как собак из питомников, так и домашних собак [23]. У пораженных собак наблюдалась пневмония различной степени тяжести, и ВГС-H3N8 легко передавался от инфицированных собак другим восприимчивым собакам при прямом контакте [34]. Инфекция ВГС-H3N8 также sporadически регистрировалась в других частях мира, таких как Канада, Великобритания, Австралия, Китай и Нигерия [35], но при этом продолжающейся циркуляции ВГС-H3N8 в этих регионах не отмечено. Риск появления ВГС-H3N8 остается очень низким [36-40]. Подтип ВГС-H3N8, по-видимому, циркулирует в крупных городских приютах для животных, где восприимчивые животные живут в плотной популяции [41-45]. Примечательно, что с 2016 г. не было зарегистрировано случаев заражения ВГС-H3N8.

В 2006 г. новый подтип ВГА H3N2 возник у собак в Китае и Южной Корее, а затем быстро распространился в нескольких районах Юго-Восточной Азии, где в настоящее время он стабильно циркулирует в собачьей популяции, став эндемичным [22-24, 46-48]. ВГС-H3N2 впервые выявлен в США в 2015 г. как возбудитель

эпидемических вспышек тяжелых респираторных заболеваний, поразивших более 1000 собак в Чикаго и близлежащих районах [49-51]. Распространение ВГА в США и Канаде могло произойти в результате появления собак, импортированных из Азии в США [52]. Несмотря на местные меры контроля, вирус продолжал циркулировать среди собачьей популяции и распространился на несколько других районов страны. Это свидетельствует об устойчивой передаче инфекции от собаки собаке в США из Азии, в результате сочетания нескольких локальных вспышек [49, 52]. Сообщалось также о некоторых случаях межвидовой передачи вируса кошкам [53].

НВПГ А подтипа Н7N2, циркулировавший на мясных рынках, торгующих живой птицей на востоке и северо-востоке США в 1994–2006 гг., был идентифицирован как возбудитель гриппозной инфекции в кошачьем приюте в Нью-Йорке в декабре 2016 г. Впоследствии инфекция распространилась на несколько приютов в штатах Нью-Йорк и Пенсильвания. У зараженных кошек наблюдались такие клинические признаки, как кашель, чихание и насморк [54, 55]. В экспериментальных условиях установлено, что подтип А/Н7N2 эффективно реплицируется в верхних и нижних дыхательных путях кошек и обладает способностью распространяться среди этих животных, что указывает на адаптацию птичьего варианта А/Н7N2 к кошкам. Во время вспышки ветеринар, лечивший животных, также заразился ВГА Н7N2 кошачьего происхождения, и у него появились респираторные симптомы [54]. Кроме того, случай передачи инфекции от кошки человеку был зарегистрирован у сотрудника приюта для животных, у которого обнаружили легкие симптомы заболевания и который имел непосредственный контакт с больными кошками. До настоящего времени не сообщалось о случаях передачи вируса от человека человеку [56, 57].

ВВПГ А/Н5N1 первоначально возник в Китае в 1996 г. и с тех пор распространился во многие районы мира, вызывая инфекции у многих видов птиц [58]. Собаки и кошки заражались при прямом контакте с больными птицами, особенно при употреблении их в пищу в сыром виде [59-61]. Особую озабоченность вызывали тяжелые симптомы, не ограничивающиеся поражением только органов дыхания. При этом проявлялось также поражение печени и желудочно-кишечного тракта, а во многих случаях - системная инфекция. Кроме того, сообщалось о субклиническом заражении кошек вирусом Н5N1 после контакта с инфицированными птицами или их экскрементами [62], что указывает на способность кошек служить потенциальным бессимптомным резервуаром А/Н5N1. Тем не менее, низкая распространенность антител к Н5N1 была отмечена в сыворотках крови кошек даже в районах, в которых в это же время зарегистрированы птицы, инфицированные ВВПГ Н5N1 [26, 63-66].

В Италии в 2009 г. вспышка пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 произошла в колонии из 90 бездомных кошек, содержащихся в клетках [67]. Половина животных имела признаки тяжелых респираторных и желудочно-кишечных инфекций. Образцы сыворотки и мазки из глотки были взяты у 38 из 65 выживших кошек. Более половины (55%) протестированных были серопозитивными на наличие антител к А(Н1N1)pdm09, два мазка оказались положительными на присутствие А(Н1N1)pdm09 с помощью ПЦР-анализа, подтверждая способность передачи вируса от кошки кошке [67]. Кроме того, зарегистрированы несколько спорадических случаев естественного заражения вирусами гриппа А(Н1N1)pdm09 у домашних кошек, проявляющих клинические признаки острой респираторной инфекции [68–72]. В последних случаях наиболее вероятным источником заражения оказались люди, поскольку владельцы инфицированных кошек также имели в анамнезе тяжелые респираторные заболевания с подтвержденным инфицированием вирусом А(Н1N1)pdm09 [69,71]. Более того, наличие антител к вирусу гриппа А(Н1N1)pdm09 было обнаружено в три раза больше у домашних кошек, чем у свободно гуляющих

животных [73]. У собак также были задокументированы некоторые редкие случаи естественной инфекции A(H1N1)pdm09 [74]. Однако, несмотря на способность вируса реплицироваться в дыхательных путях собак в экспериментальных условиях, симптомы были незначительными, и передача вируса от собаки собаке проявлялась скорее неэффективно [74].

#### Реассортантные вирусы гриппа А, встречающиеся у кошек и собак

Успешная межвидовая передача ВГА зависит как от генетических факторов хозяина, так и от генетических факторов вируса, а последующее распространение вируса в новой популяции хозяина требует периода адаптации к новому хозяину [13,75]. Описаны хозяева и вирусные детерминанты, участвующие в специфичности вируса, и дальнейшие механизмы адаптации к кошкам и собакам.

#### Реассортантные вирусы гриппа птиц

Среди детерминант специфичности ВГА для хозяина особое значение имеет наличие вирусных рецепторов, восприимчивых к клеткам-хозяев, особенно тех, с которыми способен связываться вирусный гемагглютинин (НА). Большинство ВГА птиц и человека отдают предпочтение специфическим типам рецепторов, имеющим гликаны с остатками сиаловой кислоты в  $\alpha$ -2,3 (птичий рецептор) или в  $\alpha$ -2,6 (рецептор млекопитающих) связях [76]. Поскольку эпителий верхних и нижних дыхательных путей собак и кошек содержит рецепторы  $\alpha$ -2,3 сиаловой кислоты, возможна прямая передача подтипов птичьего гриппа от домашней птицы собакам или кошкам [24,77]. В основном были описаны механизмы передачи ВГС-Н3N2, хотя имелись сведения о естественных инфекциях ВГА птичьего происхождения в Китае: H9N2 [27, 31], H5N1 [58, 65], H5N6 [78], H5N2 [28].

Генетический анализ ВГА Н3N2 у собак показал, что все гены изолятов тесно связаны с ВГА Н3N2 птичьего происхождения. Сделано предположение, что весь геном вируса птичьего гриппа был передан собакам без каких-либо признаков реассортации генов [22,24,79]. Было обнаружено, что вирус наиболее широко распространен в питомниках, вероятно, из-за тесного физического контакта между инфицированной домашней птицей и собаками [79-81]. С молекулярной точки зрения обнаружено, что большинство изолятов А/Н3N2, выделенных от собак, имеют как минимум две мутации в НА (Ser159Asn и Trp222Leu), которые могли способствовать переходу вируса гриппа А/Н3N2 от птиц собакам [50, 82]. Кроме того, вполне вероятно, что постепенное накопление мутаций в восьми генных сегментах могло привести к специфической адаптации к ВГС-Н3N2 [79, 83], хотя скорость эволюции сегмента нейраминидазы была выше, чем у семи других сегментов [79]. Это также подтверждается тем фактом, что корейские изоляты ВГС-Н3N2 2012–2013 гг. реплицировались с более высоким титром и вызывали более тяжелые клинические симптомы, чем изоляты 2009 г., что ясно указывает на то, что ВГС-Н3N2 постоянно развивается в популяции собак.

Примечательно, что ВГС-Н3N2 в дальнейшем приобрел способность заражать кошек естественным путем, о чем впервые сообщили из приюта для животных в Корее [53]. Анализ геномной последовательности кошачьего изолята А/Н3N2 показал высокое сходство последовательностей (98,0–99,8%) с собачьим изолятом А/Н3N2, что позволяет предположить, что ВГС-Н3N2 может естественным образом передаваться от собак кошкам без предварительной адаптации [53,84,85]. Следовательно, это указывает на способность кошек выступать в роли промежуточного хозяина в передаче вируса А/Н3N2 среди представителей семейства кошачьих и псовых.

### Реассортантные вирусы гриппа лошадей

ВГС-Н3N8 возник после передачи вируса гриппа лошадей (ВГЛ) собакам, вероятно, в результате тесного контакта с инфицированными лошадьми [11]. Филогенетический анализ геномных последовательностей HA ВГА Н3N8 лошадей и собак показал, что все последовательности ВГС-Н3N8 объединены в одну монофилетическую группу, отличную от ВГЛ [11]. До сих пор не сообщалось о каких-либо доказательствах реассортации с другими подтипами вируса гриппа. Сравнение последовательностей Н3N8 лошадей и собак выявило ключевые аминокислотные остатки, которые могут быть вовлечены в специфичность связывания рецепторов и тропизм клеток-хозяев [23, 86, 87]. Интересно, что структурный анализ и анализ связывания с рецепторами в случае с ВГА Н3N2 подтверждают роль мутации HA Trp222Leu для облегчения межвидовой передачи вируса от лошадей собакам [88–90]. Однако нет сведений о фенотипических отличиях ВГС-Н3N8 от штаммов ВГЛ-Н3N8 с точки зрения воспроизводимости и инфекционности, что позволяет предположить, что межвидовая передача и адаптация вирусов гриппа могут быть скорее опосредованы тонкими изменениями в биологии вируса [87, 91]. Кроме того, анализ аминокислотной последовательности современных изолятов ВГС-Н3N8 показал, что возможно имел место значительный антигенный дрейф. В целом, с момента появления вируса ВГС-Н3N8 в популяции собак, исследования динамики развития показали, что он эволюционировал и разделился на несколько линий [92].

### Реассортантные вирусы гриппа человека

На сегодняшний день имеется много серологических данных, свидетельствующих о том, что кошки и собаки во всем мире могут быть инфицированы человеческими сезонными штаммами A(H1N1)pdm09 и A/H3N2, вероятно, путем прямой передачи от их владельцев [93-96]. Эта гипотеза подтверждается несколькими моментами. Прежде всего, в большинстве случаев, лица, ухаживающие за животными, или владельцы сами имели историю гриппоподобных заболеваний, и для некоторых из них это было подтверждено ПЦР. Кроме того, восприимчивость кошек и собак хорошо коррелировала с распространенностью гриппа в популяции людей и даже следовала сезонной модели как у людей. Также выделение вируса и анализ последовательности всех восьми генов собачьих изолятов показали высокое сходство нуклеотидов, что позволяет предположить, что человеческие вирусы могут инфицировать собак и кошек без предварительной адаптации. Однако подробности о молекулярных детерминантах, потенциально связанных с передачей, до сих пор не раскрыты.

### Другие реассортантные вирусы гриппа, встречающиеся у кошек и собак

Основное внимание традиционно уделялось свиньям как основным «смешивающим сосудам» млекопитающих для рекомбинации вирусов гриппа от разных видов хозяев [97]. Поскольку в дыхательных путях свиньи расположены рецепторы  $\alpha$ -2,3 и  $\alpha$ -2,6 сиаловой кислоты, она служит носителем для генетической реассортации вируса гриппа, позволяя птичьим, свиным и человеческим подтипам ВГА рекомбинировать в последующее ко-инфекционное заболевание. Зная, что оба рецептора обнаружены в дыхательных органах собак и кошек [98-100], эти животные могут быть одновременно или последовательно инфицированы вирусами птичьего гриппа и/или гриппа млекопитающих, что делает их возможными хозяевами для генерации вирусов с новыми комбинациями геномов, с эпидемическим и/или пандемическим потенциалом.

У собак обнаружены различные генетически изменённые подтипы вируса гриппа. В 2012 г. в Южной Корее от собак был выделен новый штамм подтипа



A/H3N1. Полногеномное секвенирование штамма показало, что он содержит сегмент гена HA ВГС-Н3N2 и оставшиеся семь других сегментов гена человека A(H1N1)pdm09 [101-103]. С тех пор, по крайней мере, четыре других реассортанта, включающие ВГС-Н3N2 и A(H1N1)pdm09, были выделены от собак в Южной Азии [104, 105]. Появление новых реассортантов ВГС-Н3N2, вероятно, возникло в результате ко-инфекции ВГС-Н3N2 и A(H1N1)pdm09, что коррелирует с данными о наличии антител позитивных как к ВГС-Н3N2, так и к вирусу гриппа человека A(H1N1)pdm09 в популяции собак [24, 103].

Примечательно, что множественная геномная реассортация между ВГА H1N1 свиного происхождения и эндемичными собачьими линиями A/H3N2, совместно циркулирующими у собак, недавно была зарегистрирована у домашних собак в Китае [106]. Более того, глубокий анализ данных последовательностей ВГА различных видов показал, что ген NS ВГС-Н3N2, выделенный от китайской собаки в 2007 г., тесно связан с вирусами птичьего гриппа A/H5N1, что указывает на возможность рекомбинации между собачьим A/H3N2 и птичьим A/H5N1 вариантами [107]. Особую озабоченность вызывает тот факт, что некоторые реассортанты ВГС-Н3N2 продемонстрировали способность инфицировать и эффективно передаваться совместно проживающим собакам в экспериментальных условиях, тем самым поддерживая потенциальную адаптацию новых подтипов к популяциям собак [104, 91].

До недавнего времени считалось, что у кошек реассортации между ВГА птиц и млекопитающих не происходит. Мнение изменилось, когда новый реассортант вируса гриппа подтипа H5N6 был выделен от двух кошек в восточном Китае [108]. Оба штамма вируса гриппа были секвенированы, и генетический анализ показал, что эти вирусы получили свои гены от трех птичьих подтипов, включая вирусы гриппа подтипов H5N6 (HA, NA, PA), H9N2 (PB2, M, NS) и H7N9 (PB1, NP), выделенных в Китае. Анализ предпочтительности связывания с рецепторами изолированного кошачьего вируса H5N6 показал, что он обладает специфичностью, как к птичьим, так и к человеческим рецепторам. Кроме того, вирус A/H5N6, хотя и не был летальным, проявил способность реплицироваться с высоким титром в легких инфицированных мышей, что указывает на адаптацию к хозяину-млекопитающему [108].

### **Обсуждение**

Установлено, что собаки-компаньоны и кошки играют двойную роль в качестве хозяев вируса гриппа А, так как поддерживают меж- и внутривидовую передачу и генерируют новый ВГА посредством рекомбинации. Несмотря на то, что большинство случаев естественных межвидовых инфекций привели к ограничению последующей передачи среди собак и кошек, два подтипа гриппа в настоящее время продолжают циркулировать среди собак (ВГС-Н3N8 и ВГС-Н3N2). В то время как роль кошек менее ясна и менее задокументирована, они по-прежнему остаются восприимчивыми к вирусу гриппа (в основном к инфекциям птичьего гриппа). Это должно вызывать беспокойство, особенно у диких и бродячих кошек, которые, как правило, менее контролируемые и более тесно контактируют с птицами и другими сельскохозяйственными животными. Однако можно также предположить, что из-за социальной организации кошек, которая предотвращает прямой контакт между животными, необходимый для передачи вируса, вирус может очень неэффективно передаваться среди кошачьей популяции.

Более того, имеются данные, свидетельствующие о том, что собак и кошек следует рассматривать как сосуды для смешивания новых вирусов гриппа. Примечательно, что вирусы собачьего гриппа, и особенно вирусы подтипа ВГС-Н3N2, с момента своего появления многократно рекомбинировались с

адаптированными к птицам и млекопитающим вирусами гриппа, что ясно показывает, что генофонд птичьих, человеческих и собачьих вирусов действительно совместим. Эти новые вирусы могут в дальнейшем широко распространяться среди домашних собак и кошек и поэтому могут представлять угрозу для здоровья человека. На сегодняшний день зарегистрирован только один случай межвидового распространения от кошки человеку, и это произошло после длительного и незащищенного контакта с больными кошками и их респираторными выделениями, что указывает на низкий риск передачи инфекции от кошки человеку [109]. Скорее инфицированные люди могут быть источником инфекции домашних животных, а сочетание обратного зооноза (от человека домашним животным), потенциальная ко-инфекция и реассортация генов могут создать благоприятную экосистему для преодоления видового барьера между домашними животными и людьми.

В свете опубликованных эпидемиологических данных и текущих знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе межвидовой передачи и генетической реассортации, представляется важным усилить активное наблюдение за кошками и собаками в рамках Программы ООН «Один мир, одно здоровье». Примечательно, что реализация крупномасштабных программ серологического надзора за антителами к ВГА в популяциях собак и кошек может служить ориентиром для мониторинга общего риска воздействия на человека появляющихся зоонозных вирусов гриппа. Кроме того, информация о вирусах гриппа, циркулирующих в популяциях собак и кошек, также имеет решающее значение в выборе вирусов для создания эффективных вакцин [110], и, несомненно, поможет в профилактике и борьбе с будущими эпидемиями. Появление быстрых молекулярных диагностических тестов, таких как ПЦР в реальном времени и беспристрастное секвенирование нового поколения, могут напрямую выявлять вирусные патогены, обеспечить раннее предупреждение и более адекватную борьбу со вспышками в случае симптомов респираторного заболевания у кошек и собак. Поскольку генезис новых вирусов изучен недостаточно, дальнейшие исследования, направленные на изучение экологии, эволюции и механизмов ВГА при взаимодействии человека и животных, помогут лучше понять, какой вирус представляет серьезную угрозу для человека.

### Литература:

- 1 WHO-One Health. – URL: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/pages/action-plan/strategic-pillar-1/one-health> (дата обращения 2022-02-02).
- 2 Herfst S, Imai M, Kawaoka Y, Fouchier A. Avian influenza virus transmission to mammals. In: influenza pathogenesis and control – volume 1. Current topics in microbiology and Immunology. – Cham (Switzerland): Springer; 2014. P. 137-55.
- 3 Krog J., Hansen M., Holm E., Hjulsgaard C., Chriel M., Pedersen K, Andersen L., Abildstrom M., Jensen T. and Larsen L. Influenza A(H10N7) virus in dead harbor seals, Denmark // Emerg Infect Dis. – 2015. – Vol. 21, No. 4. – P. 684-687. doi:10.3201/eid2104.141484.
- 4 Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Baimukhametova A., Saktaganov N., Lukmanova G., Glebova T., Sayatov M., Berezin V., Nusupbaeva G. and Aikimbayev A. Detection of influenza virus and pathogens of acute respiratory viral infections in population of Kazakhstan during 2018-2019 epidemic season // Russian Journal of Infection and Immunity. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – P. 137-147. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DOI-1348>.
- 5 Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease // J Am Vet Med Assoc. -1963. – Vol. 143. – P. 587–590.
- 6 Guo Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China // Virology. – 1992. – Vol. 188. – P. 245–255. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90754-D](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)90754-D).
- 7 Saktaganov N., Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Glebova T., Lukmanova G. and Baimukhametova A. Study on antigenic relationships and biological properties of swine influenza

- A/H1N1 virus strains isolated in Northern Kazakhstan in 2018 // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. – 2020. – Vol. 55, No. 2: 355-363.
- 8 Harder, T. and Vahlenkamp, T. Influenza virus infections in dogs and cats // *Vet Immunol Immunopathol.* – 2010. – Vol. 134. – P. 54-60.
- 9 Song D., Moon H., An D., Jeoung H., Kim H., Yeom M., Hong M., Nam J., Park S., Park B., Oh J., Song M., Webster R., Kim J. and Kang B. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea // *Gen Virol.* – 2012. Vol. 93: 551–554. doi:10.1099/vir.0.037739-0.
- 10 Song D., An D., Moon H., Yeom M., Jeong H., Jeong W., Park S., Kim H., Han S., Oh J., Park B., Kim J., Poo H., Webster R., Jung K. and Kang B. Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010 // *Gen Virol.* – 2011. – Vol. 92(Pt 10), 2350-2355. doi:10.1099/vir.0.033522-0.
- 11 Crawford P.C., Dubovi E.J., Castleman W.L., Stephenson I., Gibbs E.P., Chen L., Smith C., Hill R.C., Ferro P., Pompey J., Bright R.A., Medina M.J., Johnson C.M., Olsen C.W., Cox N.J., Klimov A.I., Katz J.M., Donis R.O. Transmission of equine influenza virus to dogs // *Science.* – 2005. – Vol. 310. – P.482–485. doi: 10.1126/science.1117950.
- 12 Wright P.F., Webster R.G. Orthomyxoviruses. In: Fields / B.N. and Knipe, D.M. (eds.). – Lippincott W. & W, Philadelphia, 2001.
- 13 Joseph U., Su Y. C., Vijaykrishna D., & Smith G. J. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2017. Vol. 11. – P. 74–84. doi: 10.1111/irv.12412.
- 14 Peiris J. S., de Jong M. D., Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health // *Clin Microbiol Rev.* – 2007. – Vol. 20. – P. 243–67. doi: 10.1128/CMR.00037-06.
- 15 Yang Z.F., Mok C.K., Peiris J.S., Zhong N.S. Human infection with a novel Avian influenza A(H5N6) virus // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol. 373. – P. 487–9. doi: 10.1056/NEJMc1502983
- 16 Charles N. Post-human families? Dog-human relations in the domestic sphere // *Sociol Res Online.* – 2016. – Vol. 21. – P. 1–12. doi: 10.5153/sro.3975.
- 17 Irvine L, Cilia L. More-than-human families: pets, people, and practices in multispecies households // *Sociol Comp.* – 2017. – Vol. 11. doi: 10.1111/soc4.12455.
- 18 AVMA. 2017–2018 Pet Ownership & Demographics Sourcebook. Schaumburg, IL., American Veterinary Medical Association, 2018.
- 19 Said A.W., Usui T., Shinya K., Ono E., Ito T., Hikasa Y., Matsuu A., Takeuchi T., Sugiyama A., Nishii N., Yamaguchi T. A sero-survey of subtype H3 influenza A virus infection in dogs and cats in Japan // *Journal of Veterinary Medical Science.* – 2011. – Vol. 73. P. 541–544. doi: 10.1292/jvms.10-0428.
- 20 Coppinger R., Coppinger L. Dogs: A Startling New Understanding of Canine Origin, Behavior & Evolution. Scribner, New York, 2001.
- 21 Wasik B.R., Voorhees I., Parrish C.R. Canine and Feline Influenza // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* – 2021. – Vol. 11(1). – P. a038562 (doi: 10.1101/cshperspect.a038562).
- 22 Li S., Shi Z., Jiao P., Zhang G., Zhong Z., Tian W., Long L. P., et al. Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China // *Infect Genet Evol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1286–8. doi: 10.1016/j.meegid.2010.08.010.
- 23 Payungporn S., Crawford P.C., Kouo T.S., Chen L.M., Pompey J, CastlemanWL, et al. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida // *Emerg Infect Dis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 902–8. doi: 10.3201/eid1406.071270.
- 24 Song D., Kang B., Lee C., Jung K., Ha G., Kang D, et al. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs // *Emerg Infect Dis.* – 2008. – Vol. 14. P. 741–6. doi: 10.3201/eid1405.071471.
- 25 Wang G., Borges L.G., Stadlbauer D., Ramos I., González M.C., He J., Ding Y., Wei Z., Ouyang K., Huang W., Simon V., Fernandez-Sesma A., Krammer F., Nelson M. I., Chen Y., García-Sastre A. Characterization of swine-origin H1N1 canine influenza viruses // *Emerging Microbes & Infections.* – 2019. – Vol. 8(1). – P. 1017-1026. (doi: 10.1080/22221751.2019.1637284).

26 Songserm T., Amonsin A., Jam-on R., Sae-Heng N., Meemak N., Pariyothorn N., et al. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 681–3. doi: 10.3201/eid1204.051396.

27 Sun X., Xu X., Liu Q., Liang D., Li C., He Q., et al. Evidence of avian-like H9N2 influenza A virus among dogs in Guangxi, China // *Infect Genet Evol.* – 2013. – Vol. 20. P. 471–5. doi: 10.1016/j.meegid.2013.10.012.

28 Song Q.Q., Zhang F.X., Liu J.J., Ling Z.S., Zhu Y.L., Jiang S.J., et al. Dog to dog transmission of a Novel influenza virus (H5N2) isolated from a canine. // *Vet Microbiol.* – 2013. – Vol. 161. – P.331–3. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.040.

29 Lee I.H., Le T.B., Kim H.S., Seo S.H. Isolation of a novel H3N2 influenza virus containing a gene of H9N2 avian influenza in a dog in South Korea in 2015 // *Virus Genes.* – 2016. – Vol. 52(1). – P. 142-5. doi: 10.1007/s11262-015-1272-z.

30 Su S., Qi W., Zhou P., Xiao C., Yan Z., Cui J., Jia K., Zhang G., Gray G.C., Liao M., Li S. First evidence of H10N8 avian influenza virus infections among feral dogs in live poultry markets in Guangdong province, China // *Clin Infect Dis.* – 2014. – Vol. 59(5). – P. 748-50.

31 Zhang K., Zhang Z., Yu Z., Li L., Cheng K., Wang T., et al. Domestic cats and dogs are susceptible to H9N2 avian influenza virus // *Virus Res.* – 2013. – Vol. 175. – P. 52–7. doi: 10.1016/j.virusres.2013.04.004.

32 Borland S., Gracieux P., Jones M., Mallet F., Yugueros-Marcos J. Influenza A Virus Infection in Cats and Dogs: A Literature Review in the Light of the “OneHealth” Concept // *Frontiers in Public Health.* – 2020. – Vol. 8. doi: 10.3389/fpubh.2020.00083

33 Anderson T.C., Bromfield C.R., Crawford P.C., Dodds W.J., Gibbs E.P., Hernandez J.A. Serological evidence of H3N8 canine influenza-like virus circulation in USA dogs prior to 2004. // *Vet J.* – 2012. – Vol. 191. – P. 312–6. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.11.010.

34 Jirjis F.F., Deshpande M.S., Tubbs A.L., Jayappa H., Lakshmanan N., Wasmoen T.L. Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs // *Vet Microbiol.* – 2010. – Vol. 144. – P. 303–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.029.

35 Kruth S.A., Carman S., Weese J.S. Seroprevalence of antibodies to canine influenza virus in dogs in Ontario // *Can Vet J.* – 2008. – Vol. 49. – P. 800–802.

36 Kirkland P.D., Finlaison D.S., Crispe E., Hurt A.C. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia // *Emerg Infect Dis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 699–702. doi: 10.3201/eid1604.091489.

37 Daly J.M., Blunden A.S., MacRae S., Miller J., Bowman S.J., Kolodziejek J., et al. Transmission of equine influenza virus to english foxhounds // *Emerg Infect Dis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 461–4. doi: 10.3201/eid1403.070643.

38 Zhou P., Huang S., Zeng W., Zhang X., Wang L., Fu X., et al. Seroepidemiological evidence of subtype H3N8 influenza virus infection among pet dogs in China // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11. - doi: 10.1371/journal.pone.0159106.

39 Oluwayelu D.O., Bankole O., Ajagbe O., Adebisi A.I., Abiola J.O., Otuh P., et al. Serological survey for emerging canine H3N8 and H3N2 influenza viruses in pet and village dogs in Nigeria // *Afr J Med Med Sci.* – 2014. – Vol. 43. – P. 111–5.

40 Schulz B., Klinkenberg C., Fux R., Anderson T., de Benedictis P., Hartmann K. Prevalence of canine influenza virus A (H3N8) in dogs in Germany // *Vet J.* – 2014. – Vol. 202. – P. 184–5. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.07.008.

41 Hayward J.J., Dubovi E.J., Scarlett J.M., Janeczko S., Holmes E.C., Parrish C.R. Microevolution of canine influenza virus in shelters and its molecular epidemiology in the United States // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84. – P. 12636–45. doi: 10.1128/JVI.01350-10.

42 Barrell E.A., Pecoraro H.L., Torres-Henderson C., Morley P.S., Lunn K.F., Landolt G.A. Seroprevalence and risk factors for canine H3N8 influenza virus exposure in household dogs in Colorado // *J Vet Inter Med.* – 2010. – Vol. 24. – P. 1524–7. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0616.x.

43 Pecoraro H.L., Bennett S., Huyvaert K.P., Spindel M.E., Landolt G.A. Epidemiology and ecology of H3N8 canine influenza viruses in US shelter dogs // *J Vet Inter Med.* – 2014. – Vol. 28. – P. 311–8. doi: 10.1111/jvim.12301.

44 Holt D.E., Mover M.R., Brown D.C. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter // *J Am Vet Med Assoc.* – 2010. – Vol. 237. – P. 71–3. doi: 10.2460/javma.237.1.71.

45 Dalziel B.D., Huang K., Geoghegan J.L., Arinaminpathy N., Dubovi E.J., Grenfell B.T., et al. Contact heterogeneity, rather than transmission efficiency, limits the emergence and spread of canine influenza virus // *PLoS Pathog.* – 2014. – Vol. 10. – e1004455. doi: 10.1371/journal.ppat.1004455.

46 Crispe E., Finlaison D., Hurt A., Kirkland P. Infection of dogs with equine influenza virus: evidence for transmission from horses during the Australian outbreak // *Aust Vet J.* – 2011. – Vol. 89. – P. 27–8. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00734.x.

47 Bunpapong N., Nonthabenjawan N., Chaiwong S., Tangwangvivat R., Boonyapisitsopa S., Jairak W., et al. Genetic characterization of canine influenza A virus (H3N2) in Thailand // *Virus Genes.* – 2014. – Vol. 48. – P. 56–63. doi: 10.1007/s11262-013-0978-z.

48 Wang H., Jia K., Qi W., Zhang M., Sun L., Liang H., et al. Genetic characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses isolated from Guangdong during 2006–2012 // *Virus Genes.* – 2013. – Vol. 46. – P. 558–62. doi: 10.1007/s11262-013-0893-3.

49 Voorhees I.E.H., Glaser A.L., Toohey-Kurth K., Newbury S., Dalziel B.D., Dubovi E.J., et al. Spread of canine influenza A(H3N2) Virus, United States // *Emerg Infect Dis.* – 2017. – Vol. 23. – P. 1950–7. doi: 10.3201/eid2312.170246.

50 Pulit-Penalzoza J.A., Simpson N., Yang H., Creager H.M., Jones J., Carney P., et al. Assessment of molecular, antigenic, and pathological features of canine influenza A(H3N2) viruses that emerged in the United States // *J Infect Dis.* – 2017. Vol. 216. P. S499–507. doi: 10.1093/infdis/jiw620.

51 Voorhees I.E.H., Dalziel B.D., Glaser A., Dubovi E.J., Murcia P.R., Newbury S., et al. Multiple incursions and recurrent epidemic fade-out of H3N2 canine influenza A virus in the United States // *J Virol.* – 2018. – Vol. 92. P. e00323–18. doi: 10.1128/JVI.00323-18.

52 Weese J.S. Emergence and containment of canine influenza virus A(H3N2), Ontario, Canada, 2017–2018 // *Emerg Infect Dis.* – 2019. – Vol. 25. – P. 1810–6. doi: 10.3201/eid2510.190196.

53 Song D.S., An D.J., Moon H.J., Yeom M.J., Jeong H.Y., Jeong W.S., et al. Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010 // *J Gen Virol.* – 2011. – Vol. 92. – P. 2350–5. doi: 10.1099/vir.0.033522-0.

54 Hatta M., Gongxun Z., Yuwei G. Characterization of a Feline influenza A(H7N2) virus // *Emerg Infect Dis J.* – 2018. – Vol. 24. – P. 75. doi: 10.3201/eid2401.171240.

55 Belser J.A., Pulit-Penalzoza J.A., Sun X., Brock N., Pappas C., Creager H.M., et al. A novel A(H7N2) influenza virus isolated from a veterinarian caring for cats in a New York City animal shelter causes mild disease and transmits poorly in the Ferret model // *J Virol.* – 2017. – Vol. 91. – P. e00672-17. doi: 10.1128/JVI.00672-17.

56 Jain S., Murray E.L. The cat's meow: using novel serological approaches to identify cat-to-Human influenza A(H7N2) transmission // *J Infect Dis.* – 2018. – Vol. 219. – P. 1685–7. doi: 10.1093/infdis/jiy596.

57 Poirot E., Levine M.Z., Russell K., Stewart R.J., Pompey J.M., Chiu S., et al. Detection of Avian influenza A(H7N2) virus infection among animal shelter workers using a novel serological approach—New York City, 2016–2017 // *J Infect Dis.* – 2018. – Vol. 219. – P. 1688–96. doi: 10.1093/infdis/jiy595.

58 Li X., Zhang Z., Yu A. Global and local persistence of influenza A(H5N1) virus // *Emerg Infect Dis J.* – 2014. – Vol. 20. – P. 1287–95. doi: 10.3201/eid2008.130910.

59 Kuiken T., Rimmelzwaan G., Riel D.V., Amerongen G.V., Baars M., Fouchier R., et al. Avian H5N1 influenza in cats // *Science.* – 2004. – Vol. 306. – P. 241. doi: 10.1126/science.1102287.

60 Marschall J., Hartmann D.K. Avian influenza A H5N1 infections in cats // *J Feline Med Surg.* – 2008. – Vol. 10. – P. 359–65. doi: 10.1016/j.jfms.2008.03.005.

61 Rimmelzwaan G.F., van Riel D., Baars M., Bestebroer T.M., van Amerongen G., Fouchier R.A.M., et al. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts // *Am J Pathol.* – 2006. – Vol. 168. – P. 176–83. doi: 10.2353/ajpath.2006.050466.

62 Leschnik M., Weikel J., Möstl K., Revilla-Fernández S., Wodak E., Bagó Z., et al. Subclinical Infection with Avian influenza A H5N1 Virus in Cats // *Emerg Infect Dis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 243. doi: 10.3201/eid1302.060608.

63 Songserm T., Amonsin A., Jam-on R., Sae-Heng N., Pariyothorn N., Payungporn S., et al. Fatal Avian influenza A H5N1 in a dog // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 1744–7. doi: 10.3201/eid1211.060542.

64 Klopffleisch R., Wolf P.U., Uhl W., Gerst S., Harder T., Starick E., et al. Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds // *Vet Pathol.* – 2007. – Vol. 44. – P. 261–8. doi: 10.1354/vp.44-3-261.

65 Zhao F.R., Zhou D.H., Zhang Y.G., Shao J.J., Lin T., Li Y.F., et al. Detection prevalence of H5N1 Avian influenza virus among stray cats in eastern China // *J Med Virol.* – 2015. – Vol. 87. – P. 1436–40. doi: 10.1002/jmv.24216.

66 Marschall J., Schulz B., Harder Priv-Doz T.C., Vahlenkamp Priv-Doz T.W., Huebner J., Huisinga E., et al. Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly pathogenic Avian influenza in birds // *J Feline Med Surg.* – 2008. – Vol. 10. – P. 355–8. doi: 10.1016/j.jfms.2008.03.007.

67 Fiorentini L., Taddei R., Moreno A., Gelmetti D., Barbieri I., De Marco M.A., et al. Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 virus outbreak in a cat colony in Italy // *Zoonoses Public Health.* – 2011. – Vol. 58. – P. 573–81. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01406.x.

68 Pigott A.M., Haak C.E., Breshears M.A., Linklater A.K.J. Acute bronchointerstitial pneumonia in two indoor cats exposed to the H1N1 influenza virus // *J Vet Emerg Crit Care.* – 2014. – Vol. 24. – P. 715–23. doi: 10.1111/vec.12179.

69 Campagnolo E.R., Rankin J.T., Daverio S.A., Hunt E.A., Lute J.R., Tewari D., et al. Fatal Pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus infection in a Pennsylvania domestic cat // *Zoonoses Public Health.* – 2011. – Vol. 58. – P. 500–7. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01390.x.

70 Knight C.G., Davies J.L., Joseph T., Ondrich S., Rosa B.V. Pandemic H1N1 influenza virus infection in a Canadian cat // *Can Vet J.* – 2016. – Vol. 57. – P. 497–500.

71 Löhr C.V., DeBess E.E., Baker R.J., Hiatt S.L., Hoffman K.A., Murdoch V.J., et al. Pathology and viral antigen distribution of lethal pneumonia in domestic cats due to pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus // *Vet Pathol.* – 2010. – Vol. 47. – P. 378–86. doi: 10.1177/0300985810368393.

72 Sponseller B.A., Strait E., Jergens A. Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 virus infection in domestic cat // *Emerg Infect Dis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 534–7. doi: 10.3201/eid1603.091737.

73 Zhao F.R., Liu C.G., Yin X., Zhou D.H., Wei P., Chang H.Y. Serological report of pandemic (H1N1) 2009 infection among cats in northeastern China in 2012–02 and 2013–03 // *Virology.* – 2014. – Vol. 11. – P. 49. doi: 10.1186/1743-422X-11-49.

74 Lin D., Sun S., Du L., Ma J., Fan L., Pu J., et al. Natural and experimental infection of dogs with pandemic H1N1/2009 influenza virus // *J Gen Virol.* – 2012. – Vol. 93. – P. 119–23. doi: 10.1099/vir.0.037358-0.

75 Long J.S., Mistry B., Haslam S.M., Barclay W.S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity // *Nat Rev Microbiol.* – 2019. – Vol. 17. – P. 67–81. doi: 10.1038/s41579-018-0115-z.

76 Ito T.J., Couceiro N.S.S., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., et al. Molecular basis for the generation in pigs of Influenza A viruses with Pandemic potential // *J Virol.* – 1998. – Vol. 72. – P. 7367–73. doi: 10.1128/JVI.72.9.7367-7373.1998.

77 Lyoo K.S., Kim J.K., Kang B., Moon H., Kim J., Song M., et al. Comparative analysis of virulence of a novel, avian-origin H3N2 canine influenza virus in various host species // *Virus Res.* – 2015. – Vol. 195. – P. 135–40. doi: 10.1016/j.virusres.2014.08.020.

78 Yu Z., Gao X., Wang T., Li Y., Li Y., Xu Y., et al. Fatal H5N6 Avian influenza virus infection in a domestic cat and wild birds in China // *Sci Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 10704. doi: 10.1038/srep10704.

79 He W., Li G., Zhu H., Shi W., Wang R., Zhang C., et al. Emergence and adaptation of H3N2 canine influenza virus from avian influenza virus: an overlooked role of dogs in interspecies transmission // *Transbound Emerg Dis.* – 2019. – Vol. 66. – P. 842–51. doi: 10.1111/tbed.13093.



80 Lee C., Song D., Kang B., Kang D., Yoo J., Jung K., et al. A serological survey of avian origin canine H3N2 influenza virus in dogs in Korea // *Vet Microbiol.* – 2009. – Vol. 137. – P. 359–62. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.019.

81 Su S., Li H.T, Zhao F.R, Chen J.D, Xie J.X, Chen Z.M, et al. Avian-origin H3N2 canine influenza virus circulating in farmed dogs in Guangdong, China // *Infect Genet Evol.* – 2013. – Vol. 14. – P. 444–9. doi: 10.1016/j.meegid.2012.11.018.

82 Yang G., Li S., Blackmon S., Ye J., Bradley K.C., Cooley J., et al. Mutation tryptophan to leucine at position 222 of haemagglutinin could facilitate H3N2 influenza A virus infection in dogs // *J Gen Virol.* – 2013. – Vol. 94. – P. 2599–608. doi: 10.1099/vir.0.054692-0.

83 Lee I.W., Kim Y.I., Lim G.J., Kwon H.I., Si Y.J., Park S.J., et al. Comparison of the virulence and transmissibility of canine H3N2 influenza viruses and characterization of their canine adaptation factors // *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – Vol. 7. – P. 17. doi: 10.1038/s41426-017-0013-x.

84 Jeoung H.Y., Lim S.I., Shin B.H., Lim J.A., Song J.Y., Song D.S., et al. A novel canine influenza H3N2 virus isolated from cats in an animal shelter // *Vet Microbiol.* – 2013. – Vol. 165. – P. 281–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.021.

85 Kim H., Song D., Moon H., Yeom M., Park S., Hong M., et al. Interand intraspecies transmission of canine influenza virus. (H3N2) in dogs, cats, and ferrets // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2013. – Vol. 7. – P. 265–70. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00379.x.

86 Rivaille P., Perry I.A., Jang Y., Davis C.T., Chen L.M., Dubovi E.J., et al. Evolution of canine and equine influenza. (H3N8) viruses co-circulating between 2005 and 2008 // *Virology.* – 2010. – Vol. 408. – P. 71–9. doi: 10.1016/j.virol.2010.08.022.

87 Feng K.H., Gonzalez G., Deng L., Yu H., Tse V.L., Huang L., et al. Equine and Canine Influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence // *J Virol.* – 2015. – Vol. 89. – P. 6860. doi: 10.1128/JVI.00521-15.

88 Collins P.J., Vachieri S.G., Haire L.F., Ogrodowicz R.W., Martin S.R., Walker P.A., et al. Recent evolution of equine influenza and the origin of canine influenza // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. – Vol. 111. – P. 11175–80. doi: 10.1073/pnas.1406606111.

89 Wen F., Blackmon S., Olivier A.K., Li L., Guan M., Sun H., et al. Mutation W222L at the receptor binding site of hemagglutinin could facilitate viral adaption from Equine influenza A(H3N8) virus to dogs - *J Virol.* – 2018. – Vol. 92. – P. e01115-18. doi: 10.1128/JVI.01115-18.

90 He W., Li G., Wang R., Shi W., Li K., Wang S., et al. Host-range shift of H3N8 canine influenza virus: a phylodynamic analysis of its origin and adaptation from equine to canine host // *Vet Res.* – 2019. – Vol. 50. – P. 87. doi: 10.1186/s13567-019-0707-2.

91 Gonzalez G., Marshall J.F., Morrell J., Robb D., McCauley J.W., Perez D.R., et al. Infection and pathogenesis of canine, equine, and human influenza viruses in canine tracheas // *J Virol.* – 2014. – Vol. 88. – P. 9208–19. doi: 10.1128/JVI.00887-14.

92 Pecoraro H.L., Bennett S., Spindel M.E., Landolt G.A. Evolution of the hemagglutinin gene of H3N8 canine influenza virus in dogs // *Virus Genes.* – 2014. – Vol. 49. – P. 393–9. doi: 10.1007/s11262-014-1102-8.

93 Jang H., Jackson Y.K., Daniels J.B., Ali A., Kang K.I., Elaish M., et al. Seroprevalence of three influenza A viruses. (H1N1, H3N2, and H3N8) in pet dogs presented to a veterinary hospital in Ohio // *J Vet Sci.* – 2017. – Vol. 18. P. 291–8. doi: 10.4142/jvs.2017.18.S1.291.

94 Ramírez-Martínez L.A., Contreras-Luna M., De la Luz J., Manjarrez M.E., Rosete D.P., Rivera-Benitez J.F., et al. Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in household dogs and their owners // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2013. – Vol. 7. – P. 1292–6. doi: 10.1111/irv.12162.

95 Yin X., Zhao F.R., Zhou D.H., Wei P., Chang H.Y. Serological report of pandemic and seasonal human influenza virus infection in dogs in southern China // *Arch Virol.* – 2014. – Vol. 159. – P. 2877–82. doi: 10.1007/s00705-014-2119-y.

96 Ali A., Daniels J.B., Zhang Y., Rodriguez-Palacios A., Hayes-Ozello K., Mathes L., Lee C.W. Pandemic and seasonal human influenza virus infections in domestic cats: prevalence, association with respiratory disease, and seasonality patterns // *J Clin Microbiol.* – 2011. – Vol. 49. – P. 4101–5. doi: 10.1128/JCM.05415-11.

97 Ma W., Kahn R.E., Richt J.A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications // *J Mol Genet Med.* – 2008. – Vol. 3. – P.158–66.

98 Ning Z.Y., Wu X.T., Cheng Y.F., Qi W.B., An Y.F., Wang H., et al. Tissue distribution of sialic acid-linked influenza virus receptors in beagle dogs // *J Vet Sci.* – 2012. – Vol. 13. – P. 219–22. doi: 10.4142/jvs.2012.13.3.219.

99 Wang H., Wu X., Cheng Y., An Y., Ning Z. Tissue distribution of human and avian type sialic acid influenza virus receptors in domestic cat // *Acta Vet Hung.* – 2013. – Vol. 61. – P. 537–46. doi: 10.1556/AVet.2013.030.

100 Zhao H., Zhou J., Jiang S., Zheng B.J. Receptor binding and transmission studies of H5N1 influenza virus in mammals // *Emerg Microbes Infect.* – 2013. – Vol. 2. – P. e85. doi: 10.1038/emi.2013.89.

101 Dundon W.G., De Benedictis P., Viale E., Capua I. Serologic evidence of pandemic (H1N1) 2009 infection in dogs, Italy // *Emerg Infect Dis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 2019–21. doi: 10.3201/eid1612.100514.

102 Su S., Chen J., Jia K., Khan S.U., He S., Fu X., et al. Evidence for subclinical influenza A(H1N1)pdm09 virus infection among dogs in Guangdong Province, China // *J Clin Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 1762–5. doi: 10.1128/JCM.03522-13.

103 Song D., Moon H.J., An D.J., Jeoung H.Y., Kim H., Yeom M.J., et al. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea // *J Gen Virol.* – 2012 – Vol. 93. – P.551–4. doi: 10.1099/vir.0.037739-0.

104 Moon H., Hong M., Kim J.K., Seon B., Na W., Park S.J., et al. H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the pandemic A/H1N1 virus: infection dynamics in dogs and ferrets // *Epidemiol. Infect.* – 2015. – Vol. 143. – P. 772–80. doi: 10.1017/S0950268814001617.

105 Hong M., Na W., Yeom M., Park N., Moon H., Kang B.K., et al. Complete genome sequences of H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the Pandemic A/H1N1 virus // *Genome Announc.* – 2014. – Vol. 2. – P. e01010-14. doi: 10.1128/genomeA.01010-14.

106 Chen Y., Trovao N.S., Wang G., Zhao W., He P., Zhou H., et al. Emergence and evolution of novel reassortant influenza A viruses in canines in Southern China // *MBio.* – 2018. – Vol. 9.- P. e00909–18. doi: 10.1128/mBio.00909-18.

107 Zhu H., Hughes J., Murcia P.R. Origins and evolutionary dynamics of H3N2 canine influenza virus // *J Virol.* – 2015. – Vol. 89. – P. 5406–18. doi: 10.1128/JVI. 03395-14.

108 Cao X., Yang F., Wu H., Xu L. Genetic characterization of novel reassortant H5N6-subtype influenza viruses isolated from cats in eastern China // *Arch Virol.* – 2017. – Vol. 162. P. 3501–5. doi: 10.1007/s00705-017-3490-2.

109 Lee C.T., Slavinski S., Schiff C., Merlino M., Daskalakis D., Liu D., et al. Outbreak of influenza A(H7N2) among cats in an animal shelter with cat-tohuman transmission-New York City, 2016 // *Clin Infect Dis.* – 2017. – Vol. 65. – P. 1927–9. doi: 10.1093/cid/cix668.

110 Rodriguez L., Nogales A., Reilly E.C., Topham D.J., Murcia P.R., Parrish C.R., et al. A live-attenuated influenza vaccine for H3N2 canine influenza virus // *Virology.* – 2017. – Vol. 504. – P. 96–106. doi: 10.1016/j.virol.2017.01.020.

Н.Г. КЛИВЛЕЕВА, М.Г. ШАМЕНОВА, Т.И.ГЛЕБОВА, Н.Т. САКТАГАНОВ  
«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,  
Алматы қ. Қазақстан

## **МЫСЫҚТАР МЕН ИТТЕР ПОПУЛЯЦИЯСЫНДАҒЫ А ТҰМАУЫ ВИРУСЫНЫҢ АЙНАЛЫМЫ**

### **Түйін**

А тұмауы вирустары адамдар мен жануарлардың денсаулығына қауіп төндіретін ең күрделі вирустардың бірі болып табылады. А тұмауы вирустарының экологиясы мен эпидемиологиясы өте күрделі және үнемі дамып отыратын және түрлер тосқауылын кесіп өтетін жаңа зооноздық патогендердің пайда болуы жаһандық денсаулық қауіпсіздігінің ең күрделі мәселелерінің бірі болып табылады. А тұмауының вирустары жоғары мутация жылдамдығы мен сегменттелген геномның үйлесуі нәтижесінде пайда болатын генетикалық және антигендік

өзгеріштікпен сипатталады, яғни тез өзгеру және жаңа иелеріне бейімделу мүмкіндігін қамтамасыз етеді. Сондықтан осы вирустардың түрлері құстар мен сүтқоректілердің көптеген түрлерін қоса алғанда, әртүрлі аралық организмдерді қоздыратын вирустарға жатады. Соңғы онжылдықта иттердегі H3N8 және H3N2 тұмау вирусының инфекцияларына көп көңіл бөлінуде, әйткені Америка Құрама Штаттары мен Оңтүстік Азияда эндемикалық болып, бірнеше ауруды тудырды. Әдебиеттерде мысықтар тұмау аз сипатталса да, бұл жануарлар құс тұмауының көптеген инфекцияларына әлі де сезімтал. Бұл мақалада иттер мен мысықтардағы А тұмауы вирустарының эпидемиологиясы туралы соңғы деректер, осы түрлердің иесіне бейімделу қабілеті, тұраралық берілу және геномдық реассортация арқылы А тұмауының жаңа линияларының қалыптасуы туралы бар дәлелдер қарастырылады. Бұл кеңейтілген түсінік жақын арада болатын індеттерге және пандемияға оңтайлы дайындықты қамтамасыз ету үшін кеңейтілген мониторинг пен зерттеулерді күшейтуді қажеттілігін, сондай-ақ «Бір тұтас денсаулық» тұжырымдамасы [1] және жана зооноздық вирустардың ықтимал пайда болуы тұрғысынан үй жануарлары мен адам әрекетінің рөлін бақылау қажеттілігін ұсынады.

**Кілтті сөздер:** вирус, тұмау, зооноз, ит, мысық, түр аралық берілу, реассортация

IRSTI: 34.25.29

N.G. KLIVLEYEVA, M.G. SHAMENOVA, T.I. GLEBOVA, N.T. SAKTAGANOV  
LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty,  
Kazakhstan

## CIRCULATION OF INFLUENZA A VIRUSES IN CANINE AND FELINE POPULATIONS

**doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.01**

### Abstract

Influenza A viruses are important pathogens worldwide that threaten human and animal health. The ecology and epidemiology of influenza A viruses are very complex and the emergence of novel zoonotic pathogens, that are continually evolving and overcoming the interspecies barrier is one of the greatest challenges to global security in the healthcare sector. Influenza A viruses are characterized by genetic and antigenic variability resulting from a combination of high mutation rates and a segmented genome that provides the ability to rapidly change and adapt to new hosts. Therefore, this category of viruses has a diverse host range, including a large number of avian and mammalian species. Influenza virus infections in dogs have received considerable attention during the past decade since two subtypes of influenza virus, H3N8 and H3N2, caused several outbreaks in the United States and Southern Asia, having become endemic. Although influenza in cats has been less described in the literature, these animals still appear to be susceptible to numerous avian influenza infections. Although influenza epidemics pose a health hazards to dogs and cats, the risks to humans are substantially unknown. This paper reviews the latest data on the epidemiology of influenza A viruses in dogs and cats, the existing evidences for the ability of these species to adapt to the host, intraspecific transmission and the formation of new influenza A lines through genomic reassortment. This enhanced understanding suggests the need to strengthen monitoring and research to ensure optimal readiness for imminent outbreaks and pandemics, and surveillance of the role of companion human-animal interactions in light of the One Health concept [1] and the potential emergence of novel zoonotic viruses.

**Key words:** virus, influenza, zoonosis, dog, cat, interspecies transmission, reassortment

The influenza virus is of great importance because it poses an immediate threat to humans and animals. Among the four types of influenza virus (A, B, C and D), influenza A viruses (IAV) are the most clinically important, causing severe epidemics in humans and domestic animals. Wild migratory birds and bats are the main natural reservoirs, from which the virus can be transmitted to other animal hosts such as ducks, chickens, horses, pigs, whales, cats, dogs, etc. [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. IAVs normally have a limited host range, but are sometimes transmitted from one species to another [11, 12, 13]. A high mutation rate combined with a high speed of replication and reassortment allows the virus to quickly adapt to changes in the environment. Ultimately, this could lead to the creation of a virus capable of replicating in the human body and possessing new antigenic properties, which could cause a pandemic outbreak. It is noteworthy that poultry and swine pose a serious threat to human health in the first place, since historically most human pandemics have originated from birds and swine [14, 15]. Due to the fact that the number of cat and dog owners in the world is currently increasing, and social behavior tends to register these animal species as family members [16-18], epidemiological investigation of IAV in dogs and cats and the modes of their transmission remain a relevant task.

#### Emergence IAV and subsequent spread among dogs and cats

Most pets are kept in small numbers in residences, and many have no or only brief and infrequent contact with other members of the same species, so influenza transmission is not effective. However, some domestic dogs and cats are kept in dense populations such as kennels or animal shelters. Under such conditions, contact between dogs and cats is unavoidable, and if influenza viruses enter the population, sustained transmission of some strains is possible, which can lead to persistent outbreaks and epidemic or epizootic potential. Close contact of dogs and cats with humans may also be responsible for the zoonotic potential of influenza viruses and may contribute to the infection of dogs or cats with human influenza viruses.

Currently, influenza in cats and dogs is caused by five subtypes of IAV described in the literature. These are variants of equine and avian IAV H3N8 [19, 20, 21] and H3N2 [22, 23, 24], low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) H7N2, highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) H5N1 as well as the pandemic H1N1 virus [25, 26] which currently continues to circulate as the seasonal influenza virus in humans. There are reports about circulating among cats and dogs with signs of respiratory infection of other subtypes such as H5N6, H5N2, H3N1, H9N2, and H10N8 [27, 28, 29, 30, 31]. These are mainly influenza viruses of avian origin or genetic reassortants formed following co-infection with different avian, swine and human IAVs. Reports of infection with the human IAV variant of seasonal types in cats and dogs have been published, but to a much lesser extent [32].

The canine influenza virus (CIV) of the H3N8 subtype was first reported in 2004 during an outbreak of severe respiratory disease in racing greyhounds, but there is serological evidence for the emergence of CIV-H3N8 in 1999 [11, 23, 33]. Since that time, the virus has been considered endemic among the canine population in the USA, affecting both kennel and domestic dogs [23]. Pneumonia of varying severity was observed in affected dogs, and CIV-H3N8 was easily transmitted from infected dogs to other susceptible dogs due to direct contact [34]. CIV-H3N8 infection has also been sporadically reported in other parts of the world, including Canada, UK, Australia, China, and Nigeria [35], but there has been no continued circulation of CIV-H3N8 in these regions. The risk of appearing CIV-H3N8 remains very low [36–40]. The CIV-H3N8 subtype appears to circulate in large urban animal shelters where susceptible animals live in dense population [41–45]. It is noteworthy that no cases of CIV-H3N8 infection have been reported since 2016.

In 2006, a novel IAV H3N2 subtype emerged in dogs in China and South Korea, and further quickly spread to several areas of Southeast Asia, where it is now stably circulating in the canine population, having become endemic [22-24, 46-48]. CIV-H3N2 was first identified in the USA in 2015 as a causative agent of epidemic outbreaks of severe respiratory disease that affected more than 1,000 dogs in Chicago and surrounding areas [49-51]. The spread of IAV in the USA and Canada could have occurred with the emergence of dogs imported from Asia into the USA [52]. Despite local control measures, the virus has continued to circulate in the canine population and has spread to several other areas of the country. This indicates sustained dog-to-dog transmission of infection in the USA from Asia, resulting from a combination of several local outbreaks [49, 52]. Some cases of interspecies transmission of the virus to cats have also been reported, which are described in the “Interspecies transmission of influenza A virus in cats and dogs” section of present paper [53].

LPAIV A of the H7N2 subtype, which circulated in meat markets selling live poultry in the eastern and northeastern USA during 1994–2006, was identified as the causative agent of influenza infection in a cat shelter in New York in December 2016. The infection subsequently spread to several shelters in the states of New York and Pennsylvania. Infected cats have shown clinical signs such as coughing, sneezing, and running nose [54, 55]. Under experimental conditions, it was found that the A/H7N2 subtype effectively replicates in the cat upper and lower respiratory tracts and had the ability to spread among these animals, which indicates the adaptation of the avian A/H7N2 variant to cats. During the outbreak, the veterinarian treating the animals was also infected with feline H7N2 AIV and exhibited respiratory symptoms [54]. In addition, a case of cat-to-human transmission was reported in an animal shelter employee who showed mild symptoms of the disease and had direct contact with sick cats. No cases of human-to-human transmission of the virus have been reported up to this day [56, 57].

HPAIV A/H5N1 originally originated in China in 1996 and has since spread to many parts of the world, causing infections in many bird species [58]. Dogs and cats have become infected through direct contact with sick birds, especially when they were eaten raw [59-61]. Of particular concern were severe symptoms, not limited to the affection of the respiratory system only. At the same time, damage to the liver and gastrointestinal tract was also manifested, and in many cases a systemic infection as well. In addition, subclinical infection of cats with H5N1 virus after contact with infected birds or their feces has been reported [62], indicating thus the ability of cats to serve as a potential asymptomatic reservoir of A/H5N1. However, a low prevalence of H5N1 antibodies was found in feline serums, even in areas where birds infected with HPAIV H5N1 have been reported at the same time [26, 63–66].

In Italy an outbreak of pandemic A(H1N1)pdm09 influenza occurred in a colony of 90 caged stray cats in 2009 [67]. Half of the animals exhibited signs of severe respiratory and gastrointestinal infections. Serum samples and throat swabs were collected from 38 of the 65 surviving cats. More than half (55%) of those tested were seropositive for the presence of A(H1N1)pdm09 antibodies, with two swabs positive for the presence of A(H1N1)pdm09 by PCR, confirming cat-to-cat transmission of the virus [67]. In addition, several sporadic cases of natural infection with A(H1N1)pdm09 influenza viruses have been reported in domestic cats showing clinical signs of acute respiratory infection [68–72]. In the latter cases, humans were the most likely source of infection, as owners of infected cats also had a history of severe respiratory disease with confirmed A(H1N1)pdm09 virus infection [69, 71]. Moreover, the presence of antibodies against the influenza A(H1N1)pdm09 virus was found to be three times higher in domestic cats than in free-roaming animals [73]. Some rare cases of natural infection with A(H1N1)pdm09 have also been documented in dogs [74]. However, despite the ability of the virus to replicate in

the respiratory tract of dogs under experimental conditions, symptoms were insignificant and dog-to-dog transmission appeared to be rather ineffective [74].

#### Reassortant influenza A viruses found in cats and dogs

Successful interspecies transmission of IAV depends on both host and virus genetic factors, and subsequent spread of the virus among the new host population requires a period of adaptation to the new host [13, 75]. The hosts and viral determinants involved in the specificity of the virus are described, as well as further mechanisms of adaptation to cats and dogs.

#### Reassortant avian influenza viruses

Among the determinants of IAV specificity for a host, of particular importance is the presence of viral receptors that are susceptible to host cells, especially those to which the viral hemagglutinin (HA) is able to bind. Most avian and human IAVs show preference for specific types of receptors that have glycans with sialic acid residues in  $\alpha$ -2,3 (avian receptor) or  $\alpha$ -2,6 (mammalian receptor) linkages [76]. Since the canine and feline upper and lower respiratory tract epithelium have  $\alpha$ -2,3 sialic acid receptors, direct transmission of avian influenza subtypes from poultry to dogs or cats is possible [24, 77]. The mechanisms for CIV-H3N2 transmission have mainly been described, although there have been reports of natural infections with IAV of avian origin in China: H9N2 [27, 31], H5N1 [58, 65], H5N6 [78], H5N2 [28].

Genetic analysis of canine IAV H3N2 showed that all genes of the isolates were closely related to IAV H3N2 of avian origin. It has been suggested that the entire avian influenza virus genome was transferred to dogs without any signs of gene reassortment [22, 24, 79]. The virus has been found to be most prevalent in kennels, likely due to close physical contact between infected poultry and dogs [79–81]. From a molecular point of view, it was found that most A/H3N2 canine isolates have at least two mutations in HA (Ser159Asn and Trp222Leu), which could facilitate the transition of A/H3N2 influenza virus from birds to dogs [50, 82]. In addition, it is likely that the gradual accumulation of mutations in eight gene segments could lead to specific adaptation to CIV-H3N2 [79, 83], although the evolutionary rate of the neuraminidase segment was higher than that of the other seven segments [79]. This is also supported by the fact that the Korean CIV-H3N2 isolates (2012–2013) replicated at a higher titer and caused more severe clinical symptoms than the 2009 isolates, clearly indicating that CIV-H3N2 is constantly evolving in the dog population.

It is noteworthy that CIV-H3N2 subsequently acquired the ability to naturally infect cats, as first reported from an animal shelter in Korea [53]. Genomic sequence analysis of the feline A/H3N2 isolate showed high sequence similarity (98.0–99.8%) with the canine A/H3N2 isolate, suggesting that CIV-H3N2 can be naturally transmitted from dogs to cats without prior adaptation [53, 84, 85]. This therefore indicates an ability of cats to act as an intermediate host in the transmission of the A/H3N2 virus among feline and canine species.

#### Reassortant equine influenza viruses

CIV-H3N8 emerged after transmission of an equine influenza virus (EIV) to dogs, probably as a result of close contact with infected horses [11]. Phylogenetic analysis of the HA AIV-H3N8 genomic sequences from horses and dogs showed that all CIV-H3N8 sequences are combined into a single monophyletic group, distinct from EIV [11]. No evidence of reassortment with other influenza virus subtypes has been reported until now. A comparison of equine and canine H3N8 sequences has identified key amino acid residues that may be involved in receptor binding specificity and host cell tropism [23, 86, 87]. It is interesting that structural and receptor binding analyses for IAV H3N2 support



the role of the HA Trp222Leu mutation in facilitating interspecies transmission of the virus from horses to dogs [88–90]. However, there are no reports of phenotypic differences between CIV-H3N8 and EIV-H3N8 strains in terms of reproducibility and infectivity, suggesting that interspecies transmission and adaptation of influenza viruses may be rather mediated by subtle changes in the virus biology [87, 91]. In addition, analysis of the amino acid sequence from contemporary CIV-H3N8 isolates indicated that there may have been significant antigenic drift. In general, since the emergence of the CIV-H3N8 virus in the canine population, evolution dynamics studies showed that it has evolved and split into several lineages [92].

#### Reassortant human influenza viruses

As of today, there is much serological evidence that cats and dogs around the world can be infected with human seasonal strains of A(H1N1)pdm09 and A/H3N2, probably through direct transmission from their owners [93-96]. This hypothesis is supported by several aspects. First of all, in most cases, the animal caretakers or owners themselves had a history of influenza-like illness, and for some of them this was confirmed by PCR. In addition, susceptibility in cats and dogs correlated well with the influenza prevalence in the human population and even followed a seasonal pattern as in humans. Furthermore, virus isolation and sequence analysis of all eight genes from the canine isolates demonstrated high nucleotide similarity, suggesting that human viruses could infect dogs and cats without prior adaptation. However, details about the molecular determinants, potentially associated with transmission, have not yet been disclosed.

#### Other reassortant influenza viruses found in cats and dogs

The most attention has traditionally been paid to swine as the key mammalian “mixing vessels” for the recombination of influenza viruses from different host species [97]. Since the  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6 sialic acid receptors are located in swine respiratory tract, it serves as a vehicle for genetic reassortment of the influenza virus, allowing the avian, swine, and human IAV subtypes to recombine into a subsequent co-infectious disease. Knowing that both receptors are found in the respiratory organs of dogs and cats [98-100], these animals could be simultaneously or sequentially infected with avian and/or mammalian influenza viruses, which make them possible hosts for generating viruses with the novel combinations of genomes and an epidemic and/or pandemic potential.

#### Different genetically modified influenza virus subtypes have been revealed in dogs

In 2012, a novel strain of the A/H3N1 subtype was isolated from dogs in South Korea. Whole-genome sequencing of the strain showed that it contained the HA gene segment from CIV-H3N2 and the remaining seven other gene segments of the human A(H1N1)pdm09 [101-103]. Since then, at least four other reassortants, including CIV-H3N2 and A(H1N1)pdm09, have been isolated from dogs in Southern Asia [104, 105]. The emergence of novel CIV-H3N2 reassortants probably has resulted from co-infection of CIV-H3N2 and A(H1N1)pdm09, which correlated with the data confirming the presence of antibodies positive for both CIV-H3N2 and human influenza virus A(H1N1)pdm09 in the canine population [24, 103].

It is noteworthy that multiple genomic reassortment between swine-origin IAV H1N1 and endemic canine A/H3N2 lineages co-circulating in dogs has recently been reported in domestic dogs in China [106]. Moreover, a deep analysis of IAV sequence data from different species showed that the NS gene of CIV-H3N2 isolated from a Chinese dog in 2007 is closely related to avian influenza A/H5N1 viruses, indicating the possibility of recombination between canine A/H3N2 and avian A/H5N1 variants [107]. Of particular concern is the fact that some CIV-H3N2 reassortants have demonstrated the ability to

infect and effectively transmit to cohabiting dogs under experimental conditions, thereby supporting the potential adaptation of novel subtypes to canine populations [104, 91].

Until recently it was believed that reassortment between avian and mammalian IAVs did not occur in cats. This opinion has changed when a novel reassortant of the H5N6 subtype influenza virus was isolated from two cats in eastern China [108]. Both strains of the influenza virus have been sequenced, and genetic analysis has shown that these viruses received their genes from three avian subtypes, including influenza virus of subtypes H5N6 (HA, NA, PA), H9N2 (PB2, M, NS), and H7N9 (PB1, NP) isolated in China. The receptor-binding preference analysis of the feline isolated H5N6 virus showed that it possesses specificity for both avian and human receptors. Moreover, the A/H5N6 virus, although not lethal, demonstrated the ability to replicate to a high titer in the lungs of infected mice, indicating adaptation to a mammalian host [108].

### **Discussion**

It was established that companion dogs and cats play a dual role as hosts for influenza A virus as they support inter- and intra-species transmission and generate novel IAV through recombination. Although most natural interspecies infections have limited subsequent transmission in dogs and cats, two influenza subtypes currently continue to circulate in dogs (CIV-H3N8 and CIV-H3N2). While the role of cats is less clear and less documented, they remain susceptible to influenza virus (primarily to avian influenza infections). This should be a cause for concern, especially for feral and free-roaming cats, that tend to be less controlled and have more close contacts with birds and other farm animals. However, it can also be hypothesized that, due to the social organization of cats, which prevents the direct contact between animals necessary for the transmission of the virus, the virus may transmit very inefficiently among the feline population.

Moreover, there is evidence to suggest that dogs and cats should be considered as mixing vessels for novel influenza viruses. It is noteworthy that canine influenza viruses, and especially those of the CIV-H3N2 subtype, have repeatedly recombined with avian- and mammalian-adapted influenza viruses since their emergence, clearly showing that the gene pool of avian, human, and canine viruses is indeed compatible. These new viruses may further spread widely among domestic dogs and cats and may therefore pose a threat to human health. As of today, only one case of interspecies cat-to-human spread has been reported, and this occurred after prolonged and unprotected contacts with sick cats and their respiratory secretions, indicating a low risk of cat-to-human transmission [109]. Rather infected humans may be the source of infection for domestic animals, and the combination of reverse zoonosis (from humans to domestic animals), potential co-infection, and gene reassortment may create a favorable ecosystem for crossing the species barrier between domestic animals and humans.

In light of published epidemiological data and current knowledge of the molecular mechanisms underlying interspecies transmission and genetic reassortment, it seems important to strengthen active surveillance of cats and dogs as part of “One World, One Health”. It is noteworthy that the implementation of large-scale IAV antibody serosurveillance programs in canine and feline populations may serve as a guideline for monitoring the overall risk of human exposure to emerging zoonotic influenza viruses. In addition, information about influenza viruses circulating in canine and feline populations is also crucial in selecting viruses for the development of effective vaccines [110], and will undoubtedly help in the prevention and control of future epidemics. The advent of rapid molecular diagnostic tests, such as real-time PCR and unbiased next-generation sequencing, can directly detect viral pathogens, provide early warning and more adequate outbreak control for respiratory symptoms in cats and dogs. Since the genesis of novel viruses is not well understood, further research aimed at studying the ecology, evolution

and mechanisms of IAV in human-animal interactions will help to better understand which virus poses a serious threat to humans.

### References:

- 1 WHO-One Health. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/health-emergencies/pages/action-plan/strategic-pillar-1/one-health>.
- 2 Herfst S, Imai M, Kawaoka Y, Fouchier A. Avian influenza virus transmission to mammals. In: influenza pathogenesis and control – volume 1. Current topics in microbiology and Immunology. Cham (Switzerland): Springer; 2014. P. 137-55.
- 3 Krog J., Hansen M., Holm E., Hjulsager C., Chriel M., Pedersen K, Andersen L., Abildstrom M., Jensen T. and Larsen L. Influenza A(H10N7) virus in dead harbor seals, Denmark. *Emerg Infect Dis.*, 2015, 21(4): 684-687. doi:10.3201/eid2104.141484.
- 4 Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Baimukhametova A., Saktaganov N., Lukmanova G., Glebova T., Sayatov M., Berezin V., Nusupbaeva G. and Aikimbayev A. Detection of influenza virus and pathogens of acute respiratory viral infections in population of Kazakhstan during 2018-2019 epidemic season. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, 11(1): 137-147. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DOI-1348>.
- 5 Waddell GH, Teigland MB, Sigel MM. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J Am Vet Med Assoc*, 1963, 143: 587–590.
- 6 Guo Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology*, 1992, 188: 245–255. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90754-D](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)90754-D).
- 7 Saktaganov N., Klivleyeva N., Ongarbayeva N., Glebova T., Lukmanova G. and Baimukhametova A. Study on antigenic relationships and biological properties of swine influenza A/H1N1 virus strains isolated in Northern Kazakhstan in 2018. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2020, 55(2): 355-363.
- 8 Harder, T. and Vahlenkamp, T. Influenza virus infections in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 134: 54-60.
- 9 Song D., Moon H., An D., Jeoung H., Kim H., Yeom M., Hong M., Nam J., Park S., Park B., Oh J., Song M., Webster R., Kim J. and Kang B. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea. *J. Gen Virol*, 2012, 93: 551–554. doi:10.1099/vir.0.037739-0.
- 10 Song D., An D., Moon H., Yeom M., Jeong H., Jeong W., Park S., Kim H., Han S., Oh J., Park B., Kim J., Poo H., Webster R., Jung K. and Kang B. Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010. *J Gen Virol*. 2011;92(Pt 10):2350-2355. doi:10.1099/vir.0.033522-0.
- 11 Crawford P.C., Dubovi E.J., Castleman W.L., Stephenson I., Gibbs E.P., Chen L., Smith C., Hill R.C., Ferro P., Pompey J., Bright R.A., Medina M.J., Johnson C.M., Olsen C.W., Cox N.J., Klimov A.I., Katz J.M., Donis R.O. Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, 2005, 310: 482–485. doi: 10.1126/science.1117950.
- 12 Wright, P.F., Webster, R.G. Orthomyxoviruses. In: Fields / B.N. and Knipe, D.M. (eds.). Lippincott W. & W, Philadelphia, 2001.
- 13 Joseph U., Su Y. C., Vijaykrishna D., & Smith G. J. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza Other Respir Viruses*, 2017, 11: 74–84. doi: 10.1111/irv.12412
- 14 Peiris J. S., de Jong M. D., Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20: 243–67. doi: 10.1128/CMR.00037-06.
- 15 Yang Z.F., Mok C.K., Peiris J.S., Zhong N.S. Human infection with a novel Avian influenza A(H5N6) virus. *N Engl J Med.*, 2015, 373: 487–9. doi: 10.1056/NEJMc1502983
- 16 Charles N. Post-human families? Dog-human relations in the domestic sphere. *Sociol Res Online*, 2016), 21: 1–12. doi: 10.5153/sro.3975.
- 17 Irvine L, Cilia L. More-than-human families: pets, people, and practices in multispecies households. *Sociol Comp*, 2017, 11: e12455. doi: 10.1111/soc4.12455.
- 18 AVMA. 2017–2018 Pet Ownership & Demographics Sourcebook. Schaumburg, IL., American Veterinary Medical Association, 2018.

- 19 Said A.W., Usui T., Shinya K., Ono E., Ito T., Hikasa Y., Matsuu A., Takeuchi T., Sugiyama A., Nishii N., Yamaguchi T. A sero-survey of subtype H3 influenza A virus infection in dogs and cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2011, 73: 541–544 (doi: 10.1292/jvms.10-0428).
- 20 Coppinger R., Coppinger L. *Dogs: A Startling New Understanding of Canine Origin, Behavior & Evolution*. Scribner, New York, 2001.
- 21 Wasik B.R., Voorhees I., Parrish C.R. Canine and Feline Influenza. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2021, 11(1): a038562 (doi: 10.1101/cshperspect.a038562).
- 22 Li S., Shi Z., Jiao P., Zhang G., Zhong Z., Tian W., Long L.P., et al. Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China. *Infect Genet Evol.* 2010, 10: 1286–8. doi: 10.1016/j.meegid.2010.08.010.
- 23 Payungporn S., Crawford P.C., Kouo T.S., Chen L.M., Pompey J, Castleman WL, et al. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14: 902–8. doi: 10.3201/eid1406.071270.
- 24 Song D., Kang B., Lee C., Jung K., Ha G., Kang D, et al. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. 2008, 14: 741–6. doi: 10.3201/eid1405.071471.
- 25 Wang G., Borges L. G., Stadlbauer D., Ramos I., González M. C., He J., Ding Y., Wei Z., Ouyang K., Huang W., Simon V., Fernandez-Sesma A., Krammer F., Nelson M. I., Chen Y., Garcia-Sastre A. Characterization of swine-origin H1N1 canine influenza viruses. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 1017-1026. (doi: 10.1080/22221751.2019.1637284).
- 26 Songserm T., Amonsin A., Jam-on R., Sae-Heng N., Meemak N., Pariyothorn N., et al. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12: 681–3. doi: 10.3201/eid1204.051396.
- 27 Sun X., Xu X., Liu Q., Liang D., Li C., He Q., et al. Evidence of avian-like H9N2 influenza A virus among dogs in Guangxi, China. *Infect Genet Evol.* 2013, 20: 471–5. doi: 10.1016/j.meegid.2013.10.012.
- 28 Song Q.Q., Zhang F.X., Liu J.J., Ling Z.S., Zhu Y.L., Jiang S.J., et al. Dog to dog transmission of a Novel influenza virus (H5N2) isolated from a canine. *Vet Microbiol.* 2013, 161: 331–3. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.040.
- 29 Lee I.H., Le T.B., Kim H.S., Seo S.H. Isolation of a novel H3N2 influenza virus containing a gene of H9N2 avian influenza in a dog in South Korea in 2015. *Virus Genes*, 2016, 52(1): 142-5. doi: 10.1007/s11262-015-1272-z.
- 30 Su S., Qi W., Zhou P., Xiao C., Yan Z., Cui J., Jia K., Zhang G., Gray G.C., Liao M., Li S. First evidence of H10N8 avian influenza virus infections among feral dogs in live poultry markets in Guangdong province, China. *Clin Infect Dis.* 2014, 59(5): 748-50.
- 31 Zhang K., Zhang Z., Yu Z., Li L., Cheng K., Wang T., et al. Domestic cats and dogs are susceptible to H9N2 avian influenza virus. *Virus Res.* 2013, 175: 52–7. doi: 10.1016/j.virusres.2013.04.004.
- 32 Borland S., Gracieux P., Jones M., Mallet F., Yugueros-Marcos J. Influenza A Virus Infection in Cats and Dogs: A Literature Review in the Light of the “One Health” Concept. *Frontiers in Public Health.* 2020, 8: 83. doi: 10.3389/fpubh.2020.00083.
- 33 Anderson T.C., Bromfield C.R., Crawford P.C., Dodds W.J., Gibbs E.P., Hernandez J.A. Serological evidence of H3N8 canine influenza-like virus circulation in USA dogs prior to 2004. *Vet J.* 2012, 191: 312–6. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.11.010.
- 34 Jirjis F.F., Deshpande M.S., Tubbs A.L., Jayappa H., Lakshmanan N., Wasmoen T.L. Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs. *Vet Microbiol.* 2010, 144: 303–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.029.
- 35 Kruth S.A., Carman S., Weese J.S. Seroprevalence of antibodies to canine influenza virus in dogs in Ontario. *Can Vet J.* 2008, 49: 800–2.
- 36 Kirkland P.D., Finlaison D.S., Crispe E., Hurt A.C. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2010, 16: 699–702. doi: 10.3201/eid1604.091489.
- 37 Daly J.M., Blunden A.S., MacRae S., Miller J., Bowman S.J., Kolodziejek J., et al. Transmission of equine influenza virus to english foxhounds. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14: 461–4. doi: 10.3201/eid1403.070643.

38 Zhou P., Huang S., Zeng W., Zhang X., Wang L., Fu X., et al. Seroepidemiological evidence of subtype H3N8 influenza virus infection among pet dogs in China. *PLoS ONE*. 2016, 11: e0159106. doi: 10.1371/journal.pone.0159106.

39 Oluwayelu D.O., Bankole O., Ajagbe O., Adebisi A.I., Abiola J.O., Otuh P., et al. Serological survey for emerging canine H3N8 and H3N2 influenza viruses in pet and village dogs in Nigeria. *Afr J Med Med Sci*. 2014, 43: 111–5.

40 Schulz B., Klinkenberg C., Fux R., Anderson T., de Benedictis P., Hartmann K. Prevalence of canine influenza virus A (H3N8) in dogs in Germany. *Vet J*. 2014, 202: 184–5. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.07.008.

41 Hayward J.J., Dubovi E.J., Scarlett J.M., Janeczko S., Holmes E.C., Parrish C.R. Microevolution of canine influenza virus in shelters and its molecular epidemiology in the United States. *J Virol*. 2010, 84: 12636–45. doi: 10.1128/JVI.01350-10.

42 Barrell E.A., Pecoraro H.L., Torres-Henderson C., Morley P.S., Lunn K.F., Landolt G.A. Seroprevalence and risk factors for canine H3N8 influenza virus exposure in household dogs in Colorado. *J Vet Inter Med*. 2010, 24: 1524–7. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0616.x.

43 Pecoraro H.L., Bennett S., Huyvaert K.P., Spindel M.E., Landolt G.A. Epidemiology and ecology of H3N8 canine influenza viruses in US shelter dogs. *J Vet Inter Med*. 2014, 28:311–8. doi: 10.1111/jvim.12301.

44 Holt D.E., Mover M.R., Brown D.C. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. *J Am Vet Med Assoc*. 2010, 237:71–3. doi: 10.2460/javma.237.1.71.

45 Dalziel B.D., Huang K., Geoghegan J.L., Arinaminpathy N., Dubovi E.J., Grenfell B.T., et al. Contact heterogeneity, rather than transmission efficiency, limits the emergence and spread of canine influenza virus. *PLoS Pathog*. 2014, 10:e1004455. doi: 10.1371/journal.ppat.1004455.

46 Crispe E., Finlaison D., Hurt A., Kirkland P. Infection of dogs with equine influenza virus: evidence for transmission from horses during the Australian outbreak. *Aust Vet J*. 2011, 89:27–8. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00734.x.

47 Bunpapong N., Nonthabenjawan N., Chaiwong S., Tangwangvivat R., Boonyapisitsopa S., Jairak W., et al. Genetic characterization of canine influenza A virus (H3N2) in Thailand. *Virus Genes*. 2014, 48: 56–63. doi: 10.1007/s11262-013-0978-z.

48 Wang H., Jia K., Qi W., Zhang M., Sun L., Liang H., et al. Genetic characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses isolated from Guangdong during 2006–2012. *Virus Genes*. 2013, 46: 558–62. doi: 10.1007/s11262-013-0893-3.

49 Voorhees I.E.H., Glaser A.L., Toohey-Kurth K., Newbury S., Dalziel B.D., Dubovi E.J., et al. Spread of canine influenza A(H3N2) Virus, United States. *Emerg Infect Dis*. 2017, 23:1950–7. doi: 10.3201/eid2312.170246.

50 Pulit-Penalosa J.A., Simpson N., Yang H., Creager H.M., Jones J., Carney P., et al. Assessment of molecular, antigenic, and pathological features of canine influenza A(H3N2) viruses that emerged in the United States. *J Infect Dis*. 2017, 216: S499–507. doi: 10.1093/infdis/jiw620.

51 Voorhees I.E.H., Dalziel B.D., Glaser A., Dubovi E.J., Murcia P.R., Newbury S., et al. Multiple incursions and recurrent epidemic fade-out of H3N2 canine influenza A virus in the United States. *J Virol*. 2018, 92: e00323–18. doi: 10.1128/JVI.00323-18.

52 Weese J.S. Emergence and containment of canine influenza virus A(H3N2), Ontario, Canada, 2017–2018. *Emerg Infect Dis*. 2019, 25:1810–6. doi: 10.3201/eid2510.190196.

53 Song D.S., An D.J., Moon H.J., Yeom M.J., Jeong H.Y., Jeong W.S., et al. Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010. *J Gen Virol*. 2011, 92:2350–5. doi: 10.1099/vir.0.033522-0.

54 Hatta M., Gongxun Z., Yuwei G. Characterization of a Feline influenza A(H7N2) virus. *Emerg Infect Dis J*. 2018, 24:75. doi: 10.3201/eid2401.171240.

55 Belser J.A., Pulit-Penalosa J.A., Sun X., Brock N., Pappas C., Creager H.M., et al. A novel A(H7N2) influenza virus isolated from a veterinarian caring for cats in a New York City animal shelter causes mild disease and transmits poorly in the Ferret model. *J Virol*. 2017, 91:e00672-17. doi: 10.1128/JVI.00672-17.

56 Jain S., Murray E.L. The cat's meow: using novel serological approaches to identify cat-to-human influenza A(H7N2) transmission. *J Infect Dis*. 2018, 219:1685–7. doi: 10.1093/infdis/jiy596.

57 Poirot E., Levine M.Z., Russell K., Stewart R.J., Pompey J.M., Chiu S., et al. Detection of Avian influenza A(H7N2) virus infection among animal shelter workers using a novel serological approach—New York City, 2016–2017. *J Infect Dis.* 2018, 219:1688–96. doi: 10.1093/infdis/jiy595.

58 Li X., Zhang Z., Yu A. Global and local persistence of influenza A(H5N1) virus. *Emerg Infect Dis J.* 2014, 20:1287–95. doi: 10.3201/eid2008.130910.

59 Kuiken T., Rimmelzwaan G., Riel D.V., Amerongen G.V., Baars M., Fouchier R., et al. Avian H5N1 influenza in cats. *Science.* 2004, 306:241. doi: 10.1126/science.1102287.

60 Marschall J., Hartmann D.K. Avian influenza A H5N1 infections in cats. *J Feline Med Surg.* 2008, 10: 359–65. doi: 10.1016/j.jfms.2008.03.005.

61 Rimmelzwaan G.F., van Riel D., Baars M., Bestebroer T.M., van Amerongen G., Fouchier R.A.M., et al. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am J Pathol.* 2006, 168: 176–83. doi: 10.2353/ajpath.2006.050466.

62 Leschnik M., Weikel J., Möstl K., Revilla-Fernández S., Wodak E., Bagó Z., et al. Subclinical Infection with Avian influenza A H5N1 Virus in Cats. *Emerg Infect Dis.* 2007, 13:243. doi: 10.3201/eid1302.060608.

63 Songserm T., Amonsin A., Jam-on R., Sae-Heng N., Pariyothorn N., Payungporn S., et al. Fatal Avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis.* 2006, 12: 1744–7. doi: 10.3201/eid1211.060542.

64 Klopffleisch R., Wolf P.U., Uhl W., Gerst S., Harder T., Starick E., et al. Distribution of lesions and antigen of highly pathogenic avian influenza virus A/Swan/Germany/R65/06 (H5N1) in domestic cats after presumptive infection by wild birds. *Vet Pathol.* 2007, 44:261–8. doi: 10.1354/vp.44-3-261.

65 Zhao F.R., Zhou D.H., Zhang Y.G., Shao J.J., Lin T., Li Y.F., et al. Detection prevalence of H5N1 Avian influenza virus among stray cats in eastern China. *J Med Virol.* 2015, 87:1436–40. doi: 10.1002/jmv.24216.

66 Marschall J., Schulz B., Harder Priv-Doz T.C., Vahlenkamp Priv-Doz T.W., Huebner J., Huisinga E., et al. Prevalence of influenza A H5N1 virus in cats from areas with occurrence of highly pathogenic Avian influenza in birds. *J Feline Med Surg.* 2008, 10: 355–8. doi: 10.1016/j.jfms.2008.03.007.

67 Fiorentini L., Taddei R., Moreno A., Gelmetti D., Barbieri I., De Marco M.A., et al. Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 virus outbreak in a cat colony in Italy. *Zoonoses Public Health.* 2011, 58:573–81. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01406.x.

68 Pigott A.M., Haak C.E., Breshears M.A., Linklater A.K.J. Acute bronchointerstitial pneumonia in two indoor cats exposed to the H1N1 influenza virus. *J Vet Emerg Crit Care.* 2014, 24: 715–23. doi: 10.1111/vec.12179.

69 Campagnolo E.R., Rankin J.T., Daverio S.A., Hunt E.A., Lute J.R., Tewari D., et al. Fatal Pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus infection in a Pennsylvania domestic cat. *Zoonoses Public Health.* 2011, 58:500–7. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01390.x.

70 Knight C.G., Davies J.L., Joseph T., Ondrich S., Rosa B.V. Pandemic H1N1 influenza virus infection in a Canadian cat. *Can Vet J.* 2016, 57:497–500.

71 Löhr C.V., DeBess E.E., Baker R.J., Hiatt S.L., Hoffman K.A., Murdoch V.J., et al. Pathology and viral antigen distribution of lethal pneumonia in domestic cats due to pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus. *Vet Pathol.* 2010, 47:378–86. doi: 10.1177/0300985810368393.

72 Sponseller B.A., Strait E., Jergens A. Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 virus infection in domestic cat. *Emerg Infect Dis.* 2010, 16:534–7. doi: 10.3201/eid1603.091737.

73 Zhao F.R., Liu C.G., Yin X., Zhou D.H., Wei P., Chang H.Y. Serological report of pandemic (H1N1) 2009 infection among cats in northeastern China in 2012–02 and 2013–03. *Virol J.* 2014, 11:49. doi: 10.1186/1743-422X-11-49.

74 Lin D., Sun S., Du L., Ma J., Fan L., Pu J., et al. Natural and experimental infection of dogs with pandemic H1N1/2009 influenza virus. *J Gen Virol.* 2012, 93:119–23. doi: 10.1099/vir.0.037358-0.

75 Long J.S., Mistry B., Haslam S.M., Barclay W.S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat Rev Microbiol.* 2019, 17:67–81. doi: 10.1038/s41579-018-0115-z.



- 76 Ito T.J., Couceiro N.S.S., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., et al. Molecular basis for the generation in pigs of Influenza A viruses with Pandemic potential. *J Virol.* 1998, 72:7367–73. doi: 10.1128/JVI.72.9.7367-7373.1998.
- 77 Lyoo K.S., Kim J.K., Kang B., Moon H., Kim J., Song M., et al. Comparative analysis of virulence of a novel, avian-origin H3N2 canine influenza virus in various host species. *Virus Res.* 2015, 195:135–40. doi: 10.1016/j.virusres.2014.08.020.
- 78 Yu Z., Gao X., Wang T., Li Y., Li Y., Xu Y., et al. Fatal H5N6 Avian influenza virus infection in a domestic cat and wild birds in China. *Sci Rep.* 2015, 5:10704. doi: 10.1038/srep10704.
- 79 He W., Li G., Zhu H., Shi W., Wang R., Zhang C., et al. Emergence and adaptation of H3N2 canine influenza virus from avian influenza virus: an overlooked role of dogs in interspecies transmission. *Transbound Emerg Dis.* 2019, 66:842–51. doi: 10.1111/tbed.13093.
- 80 Lee C., Song D., Kang B., Kang D., Yoo J., Jung K., et al. A serological survey of avian origin canine H3N2 influenza virus in dogs in Korea. *Vet Microbiol.* 2009, 137:359–62. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.019.
- 81 Su S., Li H.T., Zhao F.R., Chen J.D., Xie J.X., Chen Z.M., et al. Avian-origin H3N2 canine influenza virus circulating in farmed dogs in Guangdong, China. *Infect Genet Evol.* 2013, 14:444–9. doi: 10.1016/j.meegid.2012.11.018.
- 82 Yang G., Li S., Blackmon S., Ye J., Bradley K.C., Cooley J., et al. Mutation tryptophan to leucine at position 222 of haemagglutinin could facilitate H3N2 influenza A virus infection in dogs. *J Gen Virol.* 2013, 94:2599–608. doi: 10.1099/vir.0.054692-0.
- 83 Lee I.W., Kim Y.I., Lim G.J., Kwon H.I., Si Y.J., Park S.J., et al. Comparison of the virulence and transmissibility of canine H3N2 influenza viruses and characterization of their canine adaptation factors. *Emerg Microbes Infect.* 2018, 7:17. doi: 10.1038/s41426-017-0013-x.
- 84 Jeoung H.Y., Lim S.I., Shin B.H., Lim J.A., Song J.Y., Song D.S., et al. A novel canine influenza H3N2 virus isolated from cats in an animal shelter. *Vet Microbiol.* 2013, 165:281–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.021.
- 85 Kim H., Song D., Moon H., Yeom M., Park S., Hong M., et al. Interand intraspecies transmission of canine influenza virus. (H3N2) in dogs, cats, and ferrets. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013, 7:265–70. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00379.x.
- 86 Rivaller P., Perry I.A., Jang Y., Davis C.T., Chen L.M., Dubovi E.J., et al. Evolution of canine and equine influenza. (H3N8) viruses co-circulating between 2005 and 2008. *Virology.* 2010, 408:71–9. doi: 10.1016/j.virol.2010.08.022.
- 87 Feng K.H., Gonzalez G., Deng L., Yu H., Tse V.L., Huang L., et al. Equine and Canine Influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence. *J Virol.* 2015, 89:6860. doi: 10.1128/JVI.00521-15.
- 88 Collins P.J., Vachieri S.G., Haire L.F., Ogrodowicz R.W., Martin S.R., Walker P.A., et al. Recent evolution of equine influenza and the origin of canine influenza. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014, 111:11175–80. doi: 10.1073/pnas.1406606111.
- 89 Wen F., Blackmon S., Olivier A.K., Li L., Guan M., Sun H., et al. Mutation W222L at the receptor binding site of hemagglutinin could facilitate viral adaptation from Equine influenza A(H3N8) virus to dogs. *J Virol.* 2018, 92:e01115-18. doi: 10.1128/JVI.01115-18.
- 90 He W., Li G., Wang R., Shi W., Li K., Wang S., et al. Host-range shift of H3N8 canine influenza virus: a phylodynamic analysis of its origin and adaptation from equine to canine host. *Vet Res.* 2019, 50:87. doi: 10.1186/s13567-019-0707-2.
- 91 Gonzalez G., Marshall J.F., Morrell J., Robb D., McCauley J.W., Perez D.R., et al. Infection and pathogenesis of canine, equine, and human influenza viruses in canine tracheas. *J Virol.* 2014, 88:9208–19. doi: 10.1128/JVI.00887-14.
- 92 Pecoraro H.L., Bennett S., Spindel M.E., Landolt G.A. Evolution of the hemagglutinin gene of H3N8 canine influenza virus in dogs. *Virus Genes.* 2014, 49:393–9. doi: 10.1007/s11262-014-1102-8.
- 93 Jang H., Jackson Y.K., Daniels J.B., Ali A., Kang K.I., Elaiash M., et al. Seroprevalence of three influenza A viruses. (H1N1, H3N2, and H3N8) in pet dogs presented to a veterinary hospital in Ohio. *J Vet Sci.* 2017, 18:291–8. doi: 10.4142/jvs.2017.18.S1.291.
- 94 Ramírez-Martínez L.A., Contreras-Luna M., De la Luz J., Manjarrez M.E., Rosete D.P., Rivera-Benitez J.F., et al. Evidence of transmission and risk factors for influenza A virus in

household dogs and their owners. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013, 7:1292–6. doi: 10.1111/irv.12162.

95 Yin X., Zhao F.R., Zhou D.H., Wei P., Chang H.Y. Serological report of pandemic and seasonal human influenza virus infection in dogs in southern China. *Arch Virol*. 2014, 159:2877–82. doi: 10.1007/s00705-014-2119-y.

96 Ali A., Daniels J.B., Zhang Y., Rodriguez-Palacios A., Hayes-Ozello K., Mathes L., Lee C.W. Pandemic and seasonal human influenza virus infections in domestic cats: prevalence, association with respiratory disease, and seasonality patterns. *J Clin Microbiol*. 2011, 49:4101–5. doi: 10.1128/JCM.05415-11.

97 Ma W., Kahn R.E., Richt J.A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. *J Mol Genet Med*. 2008, 3:158–66.

98 Ning Z.Y., Wu X.T., Cheng Y.F., Qi W.B., An Y.F., Wang H., et al. Tissue distribution of sialic acid-linked influenza virus receptors in beagle dogs. *J Vet Sci*. 2012, 13:219–22. doi: 10.4142/jvs.2012.13.3.219.

99 Wang H., Wu X., Cheng Y., An Y., Ning Z. Tissue distribution of human and avian type sialic acid influenza virus receptors in domestic cat. *Acta Vet Hung*. 2013, 61:537–46. doi: 10.1556/AVet.2013.030.

100 Zhao H., Zhou J., Jiang S., Zheng B.J. Receptor binding and transmission studies of H5N1 influenza virus in mammals. *Emerg Microbes Infect*. 2013, 2:e85. doi: 10.1038/emi.2013.89.

101 Dundon W.G., De Benedictis P., Viale E., Capua I. Serologic evidence of pandemic (H1N1) 2009 infection in dogs, Italy. *Emerg Infect Dis*. 2010, 16:2019–21. doi: 10.3201/eid1612.100514.

102 Su S., Chen J., Jia K., Khan S.U., He S., Fu X., et al. Evidence for subclinical influenza A(H1N1)pdm09 virus infection among dogs in Guangdong Province, China. *J Clin Microbiol*. 2014, 52:1762–5. doi: 10.1128/JCM.03522-13.

103 Song D., Moon H.J., An D.J., Jeoung H.Y., Kim H., Yeom M.J., et al. A novel reassortant canine H3N1 influenza virus between pandemic H1N1 and canine H3N2 influenza viruses in Korea. *J Gen Virol*. 2012, 93:551–4. doi: 10.1099/vir.0.037739-0.

104 Moon H., Hong M., Kim J.K., Seon B., Na W., Park S.J., et al. H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the pandemic A/H1N1 virus: infection dynamics in dogs and ferrets. *Epidemiol. Infect*. 2015, 143:772–80. doi: 10.1017/S0950268814001617.

105 Hong M., Na W., Yeom M., Park N., Moon H., Kang B.K., et al. Complete genome sequences of H3N2 canine influenza virus with the matrix gene from the Pandemic A/H1N1 virus. *Genome Announc*. 2014, 2:e01010-14. doi: 10.1128/genomeA.01010-14.

106 Chen Y., Trovao N.S., Wang G., Zhao W., He P., Zhou H., et al. Emergence and evolution of novel reassortant influenza A viruses in canines in Southern China. *MBio*. 2018, 9:e00909–18. doi: 10.1128/mBio.00909-18.

107 Zhu H., Hughes J., Murcia P.R. Origins and evolutionary dynamics of H3N2 canine influenza virus. *J Virol*. 2015, 89:5406–18. doi: 10.1128/JVI.03395-14.

108 Cao X., Yang F., Wu H., Xu L. Genetic characterization of novel reassortant H5N6-subtype influenza viruses isolated from cats in eastern China. *Arch Virol*. 2017, 162:3501–5. doi: 10.1007/s00705-017-3490-2.

109 Lee C.T., Slavinski S., Schiff C., Merlino M., Daskalakis D., Liu D., et al. Outbreak of influenza A(H7N2) among cats in an animal shelter with cat-to-human transmission-New York City, 2016. *Clin Infect Dis*. 2017, 65:1927–9. doi: 10.1093/cid/cix668.

110 Rodriguez L., Nogales A., Reilly E.C., Topham D.J., Murcia P.R., Parrish C.R., et al. A live-attenuated influenza vaccine for H3N2 canine influenza virus. *Virology*. 2017, 504:96–106. doi: 10.1016/j.virol.2017.01.020.

МРНТИ: 34.27.01

А.Х. ХАСЕНОВА, Е.С. МОЛДАХАНОВ, С.Д. ЖАНТЛЕСОВА, А.Д. МАСИРБАЕВА,  
М. ЕЛУБАЕВА

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,  
г. Алматы, Казахстан

## ЭНДОФИТНЫЕ АКТИНОМИЦЕТЫ - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПРИРОДНЫХ АНТИБИОТИКОВ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.02

### Аннотация

Устойчивость к антибиотикам возрастает во всем мире и является одной из самых больших проблем в современной медицине и глобальной угрозой для здравоохранения. Новые механизмы резистентности появляются и распространяются повсюду, угрожая способности лечить распространенные инфекционные заболевания. Ввиду этого, большое значение имеет вопрос поиска новых эффективных антибиотиков, синтезируемых различными микроорганизмами – актинобактериями, немичелиальными бактериями, грибами. В настоящее время исследователи сосредоточены на выделении актинобактерий из необычных мест обитания: мангровых зарослей, пустыней, морских и пресноводных резервуаров, а также внутренних тканей растений. Микроорганизмы-эндофиты — богатый и ещё не полностью изученный источник новых природных биологически активных соединений, привлекающий внимание многих учёных во всем мире. Большой интерес представляют эндофитные актиномицеты, синтезирующие разнообразные биологические активные вещества и дающие практически неограниченные возможности для разработки новых лекарственных препаратов. В обзоре представлены данные о биологически активных метаболитах, продуцируемых эндофитными актиномицетами, обладающих противоопухолевыми, противовоспалительными, антиоксидантными, антибактериальными свойствами.

**Ключевые слова:** инфекционные заболевания, антибиотикорезистентность, эндофитные актиномицеты, метаболиты, антибиотики

Инфекционные заболевания по-прежнему остаются угрозой, являясь основной причиной смертности в развивающихся странах и серьёзной проблемой для передовых стран. Широкое применение в медицинской практике антибиотиков привело к значительным изменениям в этиологической структуре инфекционных заболеваний и неуклонному росту антибактериальной резистентности возбудителей к различным антибактериальным препаратам [1-3]. Распространение резистентности госпитальной флоры к антибактериальным препаратам наблюдается во всем мире и в последние годы эта тенденция резко возросла. Развитие антибиотикоустойчивости у многих бактериальных патогенов, в том числе множественная лекарственная устойчивость (MDR), становится одной из основных проблем современной медицины, делая традиционную терапию неэффективной, а поэтому лечение инфекций становится более сложным, с высоким уровнем развития осложнений, летальности и более дорогим [4, 5]. Это делает появление супербактерий крайне важным для здравоохранения в целом — большинство возможностей современной медицины зависит от способности бороться с инфекциями, которые могут возникнуть в результате пересадки органов, суставов, лечения рака и хронических заболеваний, таких как диабет, астма и ревматоидный артрит. Если врачи лишаются этого инструмента, почти все достижения современной медицины оказываются

бесполезны. Поэтому устойчивость бактерий к антибиотикам является одной из самых актуальных проблем общественного здравоохранения в мире.

Всемирная организация здравоохранения называет антибиотикорезистентность одной из серьезнейших угроз для здоровья населения, а ситуацию, когда люди могут погибнуть от обычных инфекций, «очень реальной возможностью» этого столетия [6]. В последних исследованиях американского Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) отмечалось, что устойчивые грамотрицательные бактерии являются серьезной глобальной проблемой общественного здравоохранения [7]. Штаммы, продуцирующие беталактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), также часто имеют гены резистентности к антимикробным препаратам других классов (аминогликозидам, фторхинолонам, ко-тримоксазолу).

Значительно возросла и полилекарственная резистентность среди грамположительных инфекционных агентов, которые становятся более распространенными изолятами во многих медицинских центрах. Более половины возбудителей ангиогенных инфекций является грамположительными бактериями, среди которых более 26,4% штаммов резистентны ко всем стандартным антибиотикам [8-10]. Спектр полирезистентных грамположительных микробов это стафилококки, резистентные к метициллину (MRSA/MRSE) или обладающие промежуточной резистентностью к гликопептидам (GISA), пневмококки с высокой степенью резистентности к пенициллину, энтерококки, резистентные к ванкомицину и микобактерии, занимающие лидирующее положение среди условно-патогенных и патогенных возбудителей инфекций [8]. Проблема устойчивости усугубляется тем, что масштабы разработки новых антибиотиков уменьшаются, в то время как действие существующих антибиотиков ослабляется. По мнению экспертов ВОЗ, существуют три группы микроорганизмов, устойчивость у которых относят к критически значимой — это энтеробактерии, синегнойная палочка и ацинетобактер, стафилококки [6]. Эти бактерии могут вызывать целый спектр заболеваний, начиная от инфекций мочеполовых путей и заканчивая инфекциями дыхательных путей. И они встречаются гораздо чаще, чем, например, возбудитель туберкулеза, для которого проблема антибиотикорезистентности стоит тоже остро. В январе 2018 года ВОЗ опубликовала отчет о глобальном кризисе резистентности к антибиотикам. В этом отчете новая глобальная антимикробная система наблюдения (GLASS), внедренная в мае 2015 года, была использована для поддержки стандартизованного наблюдения противомикробной резистентности (AMR) во всем мире [11]. Основная цель этого исследования - отслеживание связанных с резистентностью вопросов, связанных с медикаментами, используемыми для лечения стационарных и общинных инфекций в 52 странах-участницах. Основное внимание в исследовании уделяется *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. и *Acinetobacter baumannii*.

Согласно данным по Европейскому региону, резистентные инфекции приводят к значительному увеличению нагрузки на экономику и здравоохранение. По прогнозам ВОЗ, при сохранении ситуации к 2050 году, смертность вследствие неэффективности антибактериальных препаратов превысит показатели смертности от злокачественных новообразований. Устойчивость *Klebsiella pneumoniae*, распространенного возбудителя кишечной инфекции, к препаратам антибиотиков группы карбапенемов охватила все регионы мира. Широкое распространение получила резистентность *E. coli* к фторхинолонам [12-14]. Также отмечено расширение устойчивости к препаратам первой линии *Staphylococcus aureus*, вызывающего тяжелые инфекции в медицинских учреждениях и за их пределами [15-17]. Для терапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью применяются гораздо более продолжительные и менее эффективные курсы лечения, чем при обычном туберкулезе [18,19]. В последнее время отмечен высокий уровень

летальности, вызванный патогенными грибами, большинство из которых приобрело множественную лекарственную устойчивость. Грибковые инфекции, вызываемые патогенными грибами *Candida spp.*, *Cryptococcus*, *Aspergillus spp.*, являются наиболее опасными при операционных процедурах и трансплантации органов [20, 21]. Эти типы инфекционных заболеваний вызывают серьезные трудности при лечении и часто становятся причиной инвалидности и смерти пациентов. Вместе с этим постоянно появляются новые штаммы патогенных микроорганизмов, которые не поддаются лечению никакими из существующих антибиотиков.

Стремительное увеличение числа заболеваний, вызываемых резистентными формами микроорганизмов, происходит на фоне трудностей в создании новых лекарственных препаратов. Число новых антибиотиков, прошедших всесторонние испытания и рекомендованных к клиническому использованию, с каждым десятилетием неуклонно снижается [22, 23]. Проблема устойчивости усугубляется тем, что масштабы разработки новых антибиотиков уменьшаются, в то время как действие существующих антибиотиков ослабляется. За последние десятилетия ученые разработали очень мало новых антибиотиков, и большинство из недавно одобренных лекарственных средств являются слегка отличающимися вариантами уже существующих препаратов.

Инновационные антибактериальные препараты выводятся на фармацевтический рынок относительно редко, а устойчивость к ним развивается очень быстро. Найти химические вещества, которые убивают бактерии, несложно, сложнее разработать новые лекарственные средства, нетоксичные для человека. По состоянию на январь 2020 года, учёные ведут клинические исследования 50 новых антибиотиков. Однако большинство из них, как показывают испытания, менее эффективны по сравнению с существующими антибактериальными препаратами, а также ограничены узким спектром химического разнообразия [24]. В эпоху резистентности появились такие лекарственные средства как теиксобактин — антибиотик, синтезируемый грамотрицательными бактериями, проявляющий высокую эффективность против мультирезистентного штамма золотистого стафилококка, туберкулезной палочки, сибирской язвы, при этом не вызывающий побочных эффектов; бедаквилин — противотуберкулезный препарат, ингибирующий ферменты, участвующие в клеточном дыхании микобактерий. Данный препарат эффективен против штаммов с множественной и широкой резистентностью, оказывает бактерицидное и бактериостатическое действие в зависимости от дозы. SkQ1 — митохондриально направленный антиоксидант, синтезированный в НИИФХБ МГУ, показал высокую антибактериальную активность, поражая мембрану бактерий. На данный момент есть информация о его эффективности в отношении *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium sp.* и *Staphylococcus aureus*. [25, 26].

Преимуществами натуральных метаболитов являются их структурное разнообразие, несколько хиральных центров, а также их высокая активность, селективность и несколько способов действия. Многоцентровые лиганд-белковые взаимодействия натуральных метаболитов обеспечивают функциональное разнообразие и селективность в отношении более чем одной цели. Их совместимость с клетками-хозяевами и препаративные структуры гарантируют разнообразные эффекты. Возможная связь между микроорганизмами и клетками-хозяевами с помощью метаболитов микроорганизмов привела к открытию многих противоопухолевых и противовирусных соединений. Есть случаи, когда один метаболит проявляет до 10-15-и различных типов активности из-за наличия нескольких сайтов связывания с клетками хозяина [27, 28].

Почвенные микроорганизмы- актиномицеты, и в частности, *Streptomyces*, являются ценным источником природных соединений разнообразных структур с

различным спектром действия для создания новых лекарственных препаратов [29, 30]. Большинство промышленно-ценных антибиотиков получено из актиномицетов, широко распространенных в обычных экосистемах. В настоящее время акцент в открытии природных биологически активных соединений изменился в сторону недооцененных сред обитания микроорганизмов, таких как океаны, горячие источники, ледниковые отложения, а также – использования эндофитных микроорганизмов [31-34]. Поиск особых экологических ниш наряду с новыми методами выделения новых родов актинобактерий может привести к выявлению новых генных кластеров, а значит, и новых продуктов. Редкие роды актиномицетов, которые в целом считаются не стрептомицетами, и новые изоляты *Streptomyces*, обнаруженные в этих местах обитания, уже дали открытие новых противомикробных препаратов с уникальными химическими структурами, подтверждая, что микробные природные метаболиты все еще являются многообещающими источниками новых лекарственных средств [35-38].

Таким образом, благодаря своему разнообразию и эволюционной предрасположенности к продукции антибиотиков для завоевания экологических ниш в процессе конкуренции друг с другом, микроорганизмы остаются одними из наиболее эффективных продуцентов веществ с антибиотической активностью.

Эндофитные актиномицеты являются малоизученными потенциальными источниками огромного количества новых природных продуктов, имеющих большие перспективы в сельском хозяйстве и фармацевтической промышленности. В настоящее время уже обнаружены различные биологически активные метаболиты эндофитных микроорганизмов, обладающие противоопухолевыми, противовоспалительными, антиоксидантными, антибактериальными свойствами. Поэтому шансы выявить среди эндофитных актиномицетов новые продуценты и новые биологически активные вещества, очень высоки.

Исследования показали большое разнообразие видов микроорганизмов-эндофитов и выделенных из них соединений с различным биологическим действием. Из грибов-эндофитов чаще всего выделяют вторичные метаболиты. Так, эндофитный гриб *Cryptosporiopsis quercina* синтезирует вещество криптокандин, активное в отношении *Candida albicans*, *Trichophyton spp.* [39]. Из культуры эндофитного гриба *Pestalotiopsis microspora* получили амбуиновую кислоту, обладающую противогрибковым действием [40]. Культура эндофитного гриба *Periconia sp.*, выделенная из *Piper longum L.*, синтезирует биологически активное вещество алкалоидной природы — пиперин, который обладает высокой антибиотической активностью в отношении возбудителей туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* и *M. smegmatis* с минимальной подавляющей концентрацией 1,74 рМ и 2,62 рМ, соответственно [41].

Известно, что представители бактерий рода *Bacillus* синтезируют большое разнообразие антимикробных соединений. Продуцируемые эндофитами *Bacillus subtilis* вещества семейств сурфактинов, итуринов и фенгицинов обладают гемолитическими, противовирусными и антибактериальными свойствами [42]. Из эндофитного штамма бактерии *Pseudomonas viridiflava* EB273 получены липопептидные антибиотики экомицины — экомицины А, В и С. Эти вещества способны подавлять рост патогенов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* [43].

В ходе исследований по открытию новых антибиотиков из эндофитных актиномицетов выделена и изучена группа пептидных антибиотиков широкого спектра действия — мунумбицины [44]. Мунумбицины А-Д синтезируются культурой *Streptomyces* NRRL 30562, а мунумбицины Е-4 и Е-5 — *Streptomyces sp.* [45]. Все представители семейства мунумбицинов активны в отношении грамположительных бактерий, таких как *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*, включая метицилин-резистентный

штамм *S.aureus* (MRSA, ATCC 33591) и ванкомицин-резистентный штамм *E.faecalis* (VREF, ATCC 51299). Группа пептидных антибиотиков коронамицинов образуется культурой актиномицета-эндофита *Streptomyces sp.* MSU-2110, выделенной из растения *Monstera sp.* Антибиотики ингибируют рост грибов, а также обладают активностью в отношении возбудителя малярии *P. falciparum* [46]. Штамм *Streptomyces laceyi* MS53 синтезирует 6-алкилсалициловые кислоты - салацеины А и В, которые проявляют цитотоксичность в отношении линии клеток рака молочной железы человека SKBR3 с IC50 значениями 3,0 и 5,5  $\mu\text{M}$ , соответственно [47, 48]. Из эндофитного актиномицета *Streptomyces hygrosopicus* TP-A045 был выделен птероцидин, проявляющий цитотоксичность в отношении некоторых клеточных линий рака человека со значениями IC50 2,9—7,1  $\mu\text{M}$  [49]. Новый хлорсодержащий анзамин (ansamycin), названный нафтомицином К (naph-thomycin K), образуется штаммом актиномицета-эндофита *Streptomyces sp.* CS, выделенного из лекарственного растения *Maytenus hookeri*. Он показал цитотоксическую активность в отношении клеточных линий P388 и A-549 в IC50 0,07 и 3,17  $\mu\text{M}$  [50, 51]. Из культуры *Streptomyces sp.* ls9131 получено два новых макротетролида — димерный динактин (dimeric dinactin) и димерный нонактин (dimeric nonactin). Результаты анализа биологической активности показали, что димерный динактин обладает высокой противоопухолевой и антибактериальной активностью [52].

На сегодняшний день разнообразие культивируемых эндофитных актинобактерий находится на начальной стадии исследования. В растениях присутствует огромное разнообразие эндофитных актинобактерий, имеющих важное экономическое значение из-за их способности продуцировать перспективные биоактивные вещества, включая противомикробные, антиоксидантные, противораковые и другие фармацевтические соединения [53]. Из лекарственных растений Китая было выделено 560 эндофитных актиномицетов, которые проявляли антимикробную активность широкого спектра действия [54]. Подобные исследования доказывают, что эндофитные микроорганизмы являются перспективными продуцентами ценных биологически активных соединений.

Таким образом, микроорганизмы-эндофиты представляют собой богатый и далеко ещё не полностью изученный источник новых природных биологически активных соединений с различными структурами и разнообразным биологическим действием, потенциальных для применения в фармацевтической и биотехнологической практике. Существует большое разнообразие эндофитных актиномицетов до сих пор не изученных, и шансы на поиск новых микроорганизмов в малоисследованных местах обитания велики. В условиях обострения насущных проблем современного общества разработка технологий получения и применения современных конкурентоспособных и импортозамещающих микробных препаратов для различных отраслей промышленности, медицины, сельского хозяйства и экологии становится первоочередной задачей социально-экономического развития государств. Помимо применения в медицине, новые биологически активные вещества могут быть перспективны в сельском хозяйстве благодаря их способности стимулировать рост растений; уничтожать насекомых и вредителей; улучшать усвоение питательных веществ. Кроме того, эндофитные актинобактерии могут играть решающую роль в охране окружающей среды, в поддержании определенных естественных мест обитания. Возможность использования собственных разнообразных экстремальных природных субстратов открывает большие возможности для скрининга новых конкурентоспособных лекарственных веществ, что создаст основу для развития инновационной фармацевтической промышленности Казахстана.

**Литература:**

- 1 Белобородов Б.В., Гусаров, В.Г., Дехнич А.В., и др. Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами. Вестн. анестезиологии и реаниматологии. 2020; 16(1):52-83.
- 2 Huang H, Chen B, Liu G, et al. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. BMC Infect Dis. 2018;18(1):11.
- 3 Земко В.Ю., Окулич В.К., Дзядзько А.М. Мониторинг антибиоти-корезистентности микроорганизмов в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара. Трансплантология. 2018;10(4):284-97.
- 4 Габриэлян Н.И., Шарапченко С.О., Драбкина И.В. Грамотрицательные госпитальные патогены в риске развития тяжелых бактериальных инфекций. Мед. алфавит. 2019;1(15):31-35.
- 5 Andersson, D. I. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. FEMS Microbiol. Rev. 2020. V.44, P. 171–188.
- 6 World Health Organization Global action plan on antimicrobial resistance <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/864486/retrieve> 2015. 28 p
- 7 Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2009; V.48 №1. P. 1-12.
- 8 David M.Z., Dryden M., Gottlieb T., Tattevin P., Gould I.M. Recently approved antibacterials for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other Gram-positive pathogens: The shock of the new. Int. J. Antimicrob. Agents. 2017;50:303–307.
- 9 White B.P., Barber K.E., Stover K.R. Ceftaroline for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J. Health Syst. Pharm. 2017;74:201–208.
- 10 Koulenti D., Xu E., Mok I., Song A., Karageorgopoulos D. E., Armaganidis A., Lipman J., Tsiodras S. Novel Antibiotics for Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. Microorganisms 2019 Aug; 7(8): 270.
- 11 Виноградова А.Г., Кузьменков А.Ю. Практическое применение AMRmap: элементы подхода «от общего к частному» на примере *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019;21(2):181-186.
- 12 Russo A, Giuliano S, Ceccarelli G. Comparison of septic shock due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* or *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit patients. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(6):e02562-17.
- 13 Freire MP, Villela Soares Oshiro IC, Bonazzi PR. Surveillance culture for multidrug-resistant gram-negative bacteria: performance in liver transplant recipients. Infect Control. 2017. V. 45. № 3. P.40-44.
- 14 Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е, Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре. Инфекция и иммунитет. 2018;8(1):79- 84.
- 15 Timothy J. Foster Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects..FEMS Microbiology Reviews. 2017, V. 41, № 3, P. 430–449.
- 16.Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., Townsend, S. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. Medchemcomm. 2019. 10, 1231–1241.
- 17 Anuj, S. A., Gajera, H. P., Hirpara, D. G., and Golakiya, B. A. Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nanosilver. Eur. J. Pharm. Sci. 2019. 127,P. 208–216.
- 18 Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect. 2018. V.18. № 3. P. 318-327.
- 19 Joean O., Thielel T., Schütz K., Schwerk N., Sedlacek L., Kalsdorf B. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a report of cosmopolitan microbial migration and an analysis of best management practices. Infectious Diseases 2020 V.20 P.678-685.
- 20 Camacho, E., Chrissian, C., Cordero, R. J. B., Liporagi-Lopes, L., Stark, R. E., Casadevall, A. N-acetylglucosamine affects *Cryptococcus neoformans* cell-wall composition and melanin architecture. Microbiology 2017. V.163, P.1540–1556.



- 21 Chowdhary A, Sharma C, Meis J.F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):e1006290.
- 22 Luepke KH, Mohr JF. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017. V.15 № 5. P. 425–433.
- 23 Livermore D.M. The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection* 2004. V. 10, № 4. P. 1-9.
- 24 Talbot G.H., Jezek A, Murray B.E. , Jones R. N., Ebright R. H , Nau G. J. Infectious Diseases Society of America. The 10×'20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis.* 2019. V.18;№ 1. P.1-11.
- 25 Terreni M. , Taccani M., Pregolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives *Molecules* 2021, V.26. № 9, P.2671.
- 26 Hurst P. J., Morris M. A., Graham A. A., Nowick J. S., Patterson. Visualizing Teixobactin Supramolecular Assemblies and Cell Wall Damage in *B. subtilis* Using CryoEM. *ACS Omega.* 2021. V.6 № 41 , P. 27412-27417.
- 27 Куварина А. Е. Микромицеты (отдел Ascomycota порядка Eurotiales и Hypocreales) с антигрибной активностью и отбор продуцента антибиотиков-пептабиолов Дисс. на соис. уч. степени канд. биол. наук М.-2016.181с
- 28 Horak I., Engelbrecht G., Jansen van Rensburg P.J., Claassens S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides *Journal of Applied Microbiology.* 2019. V.127, № 2 P. 326-343
- 29 Behie S.W., Bonet B., Zacharia M., McClung D.J. Traxler M.F. Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ *Front. Microbiol.*, 17 January 2017 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02149>
- 30 Тренин А. С. Методология поиска новых антибиотиков: состояние и перспективы. Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т.60. С. 7-8.
- 31 Ghai, R., Mizuno, C. M., Picazo, A., Camacho, A., and Rodriguez-Valera, F. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Mol. Ecol.* 2014..V. 23.P. 6073–6090. doi: 10.1111/mec.12985.
- 32 Мачавариани Н. Г., Терехова Л. П. Биологически активные соединения, образуемые микроорганизмами-эндофитами . Антибиотики и химиотерапия. 2014. V.59. P. 5—6/
- 33 Gohain A. Gogoi A. Debnath R. Antimicrobial biosynthetic potential and genetic diversity of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants. *FEMS Microbiology Letters.* 2015. 362, no 19 fmv158.
- 34 Bore, E.k.; Halicki, S.; Kuzyakov, Y.; Dippold, M.A. Structural and physiological adaptations of soil microorganisms to freezing revealed by position-specific labeling and compound-specific <sup>13</sup>C analysis. *Biogeochemistry.* 2019. V.143. P. 207–219.
- 35 Masand M. , Jose P. A. , Menghani E. , Robinson S. Jebakumar D. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015. V.31, № 12. P.1863-1875.
- 36 Matsumoto A. , Takahashi Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J Antibiot (Tokyo)* . 2017. V. 70. № 5. P. 514-519.
- 37 Sharma H., Rai A.K., Dahiya D., Chettri R., Nigam P.S. Exploring endophytes for in vitro synthesis of bioactive compounds similar to metabolites produced in vivo by host plants. *AIMS Microbiol.* 2021. V. 7; № 2. P.175-199.
- 38 Roy S. Biotechnological Significance of Endophytic Actinobacteria an Intensive and Emerging Pursuance. *Biotech. Microbiol.* 2018. V. 9, № 4. P. 72-74.
- 39 Wang W., Tsuneda A., Gibas C.F., Currah R.S. Cryptosporiopsis species isolated from the roots of aspen in central Alberta: identification, morphology, and interactions with the host, in vitro. *Canadian Journal of Botany.* 2007.V. 85, № 12.
- 40 Fidan O., Zhan J. Discovery and engineering of an endophytic *Pseudomonas* strain from *Taxus chinensis* for efficient production of zeaxanthin diglucoside. *J. of Biological Engineering.* 2019. V.13, № 66

41 Moreno E., Varughese T., Spadafora C., Arnold A.E., Coley P.D., Kursar T.A., Gerwick W.H., Cubilla-Rios L. Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. *J Antibiot*. 2011. V.6, № 6. P.835—840.

42 Pathak K.V., Keharia H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *Biotech*. 2014. V. 4, № 3. P. 283–295. doi: 10.1007/s13205-013-0151-3

43 Christina A., Christopher V., Bhore S.J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn Rev*. 2013. V.7, № 13. P. 11–16. doi: 10.4103/0973-7847.112833

44 Castillo U.F., Strobel G.A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robison R., Condrón M.A.M., Teplow D.B., Stevens D., Yaver D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*. 2002. V.148. P. 2675–2685.

45 Castillo U.F., Strobel G.A., Mullenberg K., Condrón M.M., Teplow D.B., Folgiano V., Gallo M., Ferracane R., Mannina L., Viel S., Codde M., Robison R., Porter H., Jensen J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 296–300.

46 Christina A., Christopher V., Bhore S.J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Phcog Rev*. 2013. V.7. P. 11—16.

47 Taechowisan T., Lu C.H., Shen Y.M., Lumyong S. Antitumor activity of 4-aryl coumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. *J Cancer Res Ther*. 2007. V. 3. P. 86–91.

48 Yu Z., Zhao L.-X., Jiang C.L., Duan Y., Wong L., Carver K.C., Shuler L.A., Shen B. Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. *J Antibiot*. 2011. V.64. P.159—162.

49 Kim N., Shin J.C., Kim W., Hwang B.Y., Kim B.S., Hong Y.S., Lee D. Cytotoxic 6-alkylsalicylic acids from the endophytic *Streptomyces laceyi*. *J Antibiot*. 2006. V. 59. P.797–800.

50 Antoraz S., Santamaría R.I., Díaz M., Sanz D., Rodríguez H. Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front. Microbiol*. 2015 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00461>

51 Quinn G.A., Banat A.M., Abdelhameed A.M., Banat I.M. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *J Med Microbiol*. 2020. V.69. № 8. P. 1040–1048. doi: 10.1099/jmm.0.001232

52 Lu C.H., Shen Y.M. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 2007. V. 60. P.649–653.

53 Usmanova A.D., Ignatova L.V., Omirbekova A.A., Brazhnikova Y.V., Egamberdieva D.R., Sydykbekova R.K., Sabyrzhan T.B. Diversity of endophytic microorganisms of plants of Kazakhstan and their biological features. *Вестник КазНУ. Серия эколог.* V. 69, № 4. P. 73-80.

54 Joseph B., Priya R. M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect. *J. of Biochemistry and Molecular Biology*. 2011. V.1, № 3. P.291-309.

А.Х. ХАСЕНОВА, Е.С. МОЛДАХАНОВ, А.С. ДЖАНТЛЕСОВ, А.Д.  
МӘСИРБАЕВА, М.Е. ЕЛУБАЕВА

«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,  
Алматы қ. Қазақстан

## ЭНДОФИТТИ АКТИНОМИЦЕТТЕР-ТАБИҒИ АНТИБИОТИКТЕРДІҢ ПЕРСПЕКТИВТІ КӨЗІ

### Түйін

Антибиотикке төзімділік бүкіл әлемде артып келеді және қазіргі медицинадағы ең үлкен проблемалардың бірі және денсаулық сақтау үшін жаһандық қауіп болып табылады. Жаңа механизмдерінің тұрақтылығы пайда болады және барлық жерде таралады, бұл жалпы жұқпалы ауруларды емдеу қабілетіне қауіп төндіреді. Осыған байланысты жаңа тиімді

антибиотиктерді іздеу мәселесі үлкен маңызға ие, олардың негізгі көзі әртүрлі микроорганизмдер – актинобактериялар, мицелия түзе алмайтын бактериялар, саңырауқұлақтар синтездейтін табиғи қосылыстар болып табылады. Қазіргі уақытта зерттеушілер актинобактерияларды ерекше мекендейтін жерлерден бөлуге назар аударады: мангралар, шөлдер, теңіз және тұщы су резервуарлары, сондай-ақ өсімдіктердің ішкі тіндері. Микроорганизмдер-эндофиттер-бүкіл әлемдегі көптеген ғалымдардың назарын аударатын жаңа табиғи биологиялық белсенді қосылыстардың бай және әлі толық зерттелмеген көзі. Эндофитті актиномицеттер үлкен қызығушылық тудырады, әртүрлі биологиялық белсенді заттарды синтездейді және жаңа препараттарды әзірлеуге шексіз мүмкіндіктер береді. Шолуда эндофитті актиномицеттердің әртүрлі биологиялық белсенді метаболиттерінің ісікке қарсы, қабынуға қарсы, антиоксидантты, Бактерияға қарсы қасиеттері бар екендігі туралы мәліметтер келтірілген.

**Кілтті сөздер:** антибиотикке төзімділік, эндофиттік актиномицеттер, антибиотиктер.

IRSTI: 34.27.01

A.K. KHASSENOVA, E.S. MOLDAKHANOV, S.D. ZHANTLESSOVA,  
A.D. MASIRBAEVA, M.Y. YELUBAYEVA  
LLC «Scientific Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan

#### ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES: PROMISING SOURCE OF NATURAL ANTIBIOTICS

**doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.02**

##### **Abstract**

Antibiotic resistance is on the rise worldwide, one of the biggest problems in modern medicine and a global public health threat. New resistance mechanisms are emerging and spreading everywhere, threatening the ability to treat common infectious diseases. In view of this, the question of finding new effective antibiotics, the main source of which are natural compounds synthesized by various microorganisms - actinobacteria, nonmycelial bacteria, fungi, is of great importance. Currently, researchers are focusing on isolating actinobacteria from unusual habitats: mangroves, deserts, marine and freshwater reservoirs, and internal plant tissues. Microorganisms-endophytes are a rich and not yet fully studied source of new natural biologically active compounds, attracting the attention of many scientists around the world. Of great interest are endophytic actinomycetes, which synthesize a variety of biologically active substances and provide practically unlimited opportunities for the development of new medicines. The review presents data that various biologically active metabolites of endophytic actinomycetes have antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial properties.

**Key words:** antibiotic resistance, endophytic actinomycetes, antibiotics.

Infectious diseases are still a threat, being the main cause of death in developing countries and a serious problem for advanced countries. The widespread use of antibiotics in medical practice has led to significant changes in the etiological structure of infectious diseases and a steady increase in the antibacterial resistance of pathogens to various antibacterial drugs [1-3]. The spread of resistance of hospital flora to antibacterial drugs is observed all over the world and in recent years this trend has increased dramatically. The development of antibiotic resistance in many bacterial pathogens, including multidrug resistance (MDR), is becoming one of the main problems of modern medicine, making traditional therapy ineffective, and therefore the treatment of infections becomes more complex, with a high level of complications, mortality and expensive [4, 5]. This makes the appearance of superbugs extremely important for healthcare in general — most of the possibilities of modern medicine depend on the ability to fight infections that can arise as a

result of organ transplants, joints, cancer treatment and chronic diseases such as diabetes, asthma and rheumatoid arthritis. If doctors are deprived of this tool, almost all the achievements of modern medicine are useless. Therefore, the resistance of bacteria to antibiotics is one of the most pressing public health problems in the world.

The World Health Organization (WHO) calls antibiotic resistance one of the most serious threats to human health, and the situation when people can die from common infections is a "very real possibility" of this century [6]. Recent studies by the American Centers for Disease Control and Prevention (CDC) have noted that resistant gram-negative bacteria are a serious global public health problem [7]. Strains producing ESBL also often have resistance genes to antimicrobial drugs of other classes (aminoglycosides, fluoroquinolones, co-trimoxazole).

Poly-drug resistance among gram-positive infectious agents has also increased significantly, they are becoming more common isolates in many medical centers. More than half of the pathogens of angioinvasive infections are gram-positive bacteria, among them more than 26.4% of strains are resistant to all standard antibiotics [8-10]. The spectrum of polyresistant gram-positive microbes: *Staphylococci* resistant to methicillin (MRSA/MRSE) or having intermediate resistance to glycopeptides (GISA), *Pneumococci* with a high degree of resistance to penicillin, *Enterococci* resistant to vancomycin and mycobacteria, occupying a leading position among opportunistic and pathogenic pathogens of infections [8]. The problem of resistance is compounded by the fact that the scale of development of new antibiotics is decreasing, while the effect of existing antibiotics is weakening. According to WHO experts, there are three groups of microorganisms whose resistance is classified as critically important: *Enterobacteria*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*, *Staphylococci* [6]. These bacteria can cause a whole range of diseases, ranging from urinary tract infections to respiratory tract infections. They are much more common than, for example, the causative agent of tuberculosis, for which the problem of antibiotic resistance is also acute. In January 2018, WHO published a report on the global antibiotic resistance crisis. In this report, the new Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS), introduced in May 2015, was used to support standardized surveillance of antimicrobial resistance (AMR) worldwide [11]. The main objective of this study is to track resistance-related issues related to medications used to treat inpatient and community infections in 52 participating countries. The study focuses on *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Acinetobacter baumannii*.

According to data from the European region, resistant infections lead to a significant increase in the burden on the economy and healthcare. According to WHO forecasts, if the situation persists by 2050, mortality due to the ineffectiveness of antibacterial drugs will exceed the mortality rates from malignant neoplasms. The resistance of *Klebsiella pneumoniae*, a common intestinal bacterium, to the drug of last resort (carbapenems) has spread to all regions of the world. *E.coli* resistance to fluoroquinolones has become widespread [12-14]. *Staphylococcus aureus* resistance to first-line drugs, which causes severe infections in healthcare institutions and beyond, has also become widespread [15-17]. For the treatment of multidrug-resistant tuberculosis, much longer and less effective courses of treatment are used than for ordinary tuberculosis [18,19]. Recently, there has been a high level of mortality caused by pathogenic fungi, most of which have acquired multidrug resistance. Fungal infection, caused by pathogenic fungi *Candida* spp., *Cryptococcus*, *Aspergillus* spp., is the most dangerous during surgical procedures and organ transplantation [20, 21]. These types of infectious diseases cause serious difficulties in treatment and often cause disability and death of patients. At the same time, new strains of bacteria are constantly appearing that cannot be treated with any of the existing antibiotics.

The rapid increase in the number of diseases caused by resistant forms of microorganisms occurs against the background of difficulties in creating new drugs. The number of new antibiotics that have passed comprehensive trials and recommended for clinical use is steadily decreasing every decade [22, 23]. The problem of resistance is compounded by the fact that the scale of development of new antibiotics is decreasing, while the effect of existing antibiotics is weakening. In recent decades, scientists have developed very few new antibiotics, and most of the recently approved drugs are slightly different versions of existing ones.

Innovative antibacterial drugs are introduced to the pharmaceutical market relatively rarely, and resistance to them develops very quickly. It is not difficult to find chemicals that kill bacteria — it is more difficult to find products that will be non-toxic to humans. As of January 2020, scientists are conducting clinical development of 50 new antibiotics. However, most of them, as tests show, are less effective compared to existing antibacterial drugs, and also limited by a narrow spectrum of chemical diversity [24]. In the era of resistance, antibiotics appeared such as teixobactin (an antibiotic synthesized by bacteria), showing high efficacy against a multi-resistant strain of *Staphylococcus aureus*, tubercle bacillus, anthrax, while not causing side effects; bedaquiline is an anti-tuberculosis drug that inhibits enzymes involved in the cellular respiration of mycobacteria. It is effective against strains with multiple and broad resistance, has a bactericidal and bacteriostatic effect depending on the dose. SkQ1, a mitochondrially directed antioxidant synthesized at the MSU RIPCB, showed high antibacterial activity, affecting the bacterial membrane. At this point there is information about its effectiveness against *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium* sp. and *Staphylococcus aureus* [25, 26].

The advantages of natural metabolites are their structural diversity, several chiral centers, as well as their high activity, selectivity and several modes of action. Multicenter ligand-protein interactions of natural metabolites provide functional diversity and selectivity for more than one target. Their compatibility with host cells, preparative structures guarantee a variety of effects. The possible connection between microorganisms and host cells with the help of microbial metabolites has led to the discovery of many antitumor and antiviral compounds. There are cases when one metabolite exhibits up to 10-15 different types of activity due to the presence of several binding sites with host cells [27, 28].

Actinomycetes, and in particular *Streptomyces*, are a valuable source of natural compounds of various structures with a different spectrum of action, and so far, their value remains for screening producers and creating new medicines [29-30]. Most industrially valuable antibiotics are derived from soil microorganisms - actinomycetes, widely distributed in conventional ecosystems. Currently, the emphasis in the discovery of natural products has changed towards undervalued habitats, such as oceans, hot springs, glacial deposits, as well as endophytic microorganisms [31-34]. The search for special ecological niches along with new methods of isolating new genera of actinobacteria can lead to the identification of new gene clusters, and hence new products. Rare genera of actinomycetes, which are generally considered non-streptomyces, and new *Streptomyces* isolates found in these habitats have already yielded the discovery of new antimicrobials with unique chemical structures, confirming that microbial natural products are still a promising source for drug discovery [35-38].

Thus, microorganisms continue to be one of the most attractive sources of antibiotic activity due to their diversity and evolutionary predisposition to the production of antibiotics to conquer ecological niches in the process of competition with each other.

Endophytic actinomycetes are poorly studied potential sources of a huge number of new biologically active natural products with great prospects in agriculture and the pharmaceutical industry. Currently, various biologically active metabolites of endophytic microorganisms with antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial

properties have already been discovered. Therefore, the chances of identifying new producers and new biologically active substances among endophytic actinomycetes are very high.

Studies have shown a wide variety of types of microorganisms-endophytes and various compounds isolated from them with various biological effects. Secondary metabolites are most often isolated from endophyte fungi. Thus, the endophytic fungus *Cryptosporiopsis quercina* synthesizes the substance cryptocandin, active against *Candida albicans*, *Trichophyton* spp. [39]. Ambuic acid with antifungal action was obtained from the culture of the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* [40]. The culture of the endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L synthesizes a biologically active substance of alkaloid nature - piperine, which has a high antibiotic activity against the causative agents of tuberculosis *Mycobacterium tuberculosis* and *M. smegmatis* with a minimum suppressive concentration of 1.74 pM and 2.62 pM, respectively [41].

It is known that representatives of the genus *Bacillus* synthesize a wide variety of antimicrobial compounds. Substances of the family of surfactins, iturins and fungicides produced by *Bacillus subtilis* endophytes have hemolytic, antiviral and antibacterial properties [42]. Lipopeptide antibiotics ecomycins - ecomycins A, B and C were obtained from *Pseudomonas viridiflava* EB273 endophytic bacterium strain. These substances are capable of suppressing the growth of human pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* [43].

In the course of research on the discovery of new antibiotics from endophytic actinomycetes, a group of broad—spectrum peptide antibiotics, munumbicins, were isolated and studied [44]. Munumbicins A-D are synthesized by *Streptomyces* NRRL 30562 culture, and munumbicins E-4 and E-5 by *Streptomyces* sp. [45]. All representatives of the munumbicin family are active against gram-positive bacteria such as *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumonia*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, including the methicillin-resistant *S. aureus* strain (MRSA, ATCC 33591) and the vancomycin-resistant *E. faecalis* strain (VREF, ATCC 51299). The group of peptide antibiotics coronamycins is formed by a culture of actinomycete endophyte *Streptomyces* sp. MSU-2110 isolated from the plant *Monstera* sp. Antibiotics inhibit the growth of fungi, and also have activity against the pathogen of malaria *P. falciparum* [46]. *Streptomyces laceyi* MS53 strain synthesizes 6-alkylsalicylic acids - salaceins A and B, which show cytotoxicity against the human breast cancer cell line SKBR3 with IC<sub>50</sub> values of 3.0 and 5.5<sup>μ</sup>M, respectively [47, 48]. Pterocidin was isolated from the endophytic actinomycete *Streptomyces hygrosopicus* TP-A045. It showed cytotoxicity against some human cancer cell lines with IC<sub>50</sub> values of 2.9-7.1<sup>μ</sup>M [49]. A new chlorine-containing ansamycin called naphptomycin K is formed by actinomycete endophyte *Streptomyces* sp. CS strain isolated from the medicinal plant *Maytenus hookeri*. It showed cytotoxic activity against cell lines P388 and A-549 in IC<sub>50</sub> 0.07 and 3.17 cM [50, 51]. Two new macrotetrolides were obtained from *Streptomyces* sp. ls9131 culture — dimeric dinactin and dimeric nonactin. The results of the biological activity analysis showed that dimeric dinactin has a high antitumor and antibacterial activity [52].

To date, the variety of cultivated endophytic actinobacteria is at the initial stage of research. There is a huge variety of endophytic actinobacteria in plants, which are of great economic importance due to their ability to produce promising bioactive substances, including antimicrobial, antioxidant, anticancer and other pharmaceutical compounds [53]. 560 endophytic actinomycetes were isolated from medicinal plants in China, which showed broad-spectrum antimicrobial activity [54]. Such studies prove that endophytic microorganisms are promising producers of valuable biologically active compounds.

Thus, endophyte microorganisms represent a rich and far from fully studied source of new natural biologically active compounds with various structures and diverse biological effects, potential for use in pharmaceutical and biotechnological practice. There is a wide

variety of endophytic actinomycetes that have not yet been studied, and the chances of finding new microorganisms are great in poorly explored habitats. In the context of the aggravation of the pressing problems of modern society, the development of technologies for obtaining and applying modern competitive and import-substituting microbial preparations for various industries, medicine, agriculture and ecology is becoming a priority task of the socio-economic development of states. In addition to medical applications, new biologically active molecules can be useful in agriculture due to their ability to stimulate plant growth; repel insects and pests; improve nutrient absorption. Besides, endophytic actinobacteria can play a crucial role in environmental protection, in maintaining certain natural habitats. The possibility of using our own diverse extreme natural substrates opens up great opportunities for screening new competitive medicines, which will create the basis for the development of an innovative pharmaceutical industry.

### References:

- 1 Beloborodov B.V., Gusarov V.G., Dehnich A.V., i dr. Diagnostika i antimikrobnaja terapija infekcij, vyzvannyh polirezistentnymi mikroorganizmami. Vestn. anesteziologii i reanimatologii. 2020; 16(1):52-83.
- 2 Huang H, Chen B, Liu G, et al. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. BMC Infect Dis. 2018;18(1):11.
- 3 Zemko V.Ju., Okulich V.K., Dzijadz'ko A.M. Monitoring antibiotiki-korezistentnosti mikroorganizmov v otdelenii reanimacii i intensivnoj terapii mnogoprofil'nogo stacionara. Transplantologija. 2018;10(4):284-97.
- 4 Gabrijeljan N.I., Sharapchenko S.O., Drabkina I.V. Gramotricatel'nye gospital'nye patogeny v riske razvitija tjazhelyh bakterial'nyh infekcij. Med. alfavit. 2019;1(15):31-35.
- 5 Andersson, D. I. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. FEMS Microbiol. Rev. 2020. V.44. P. 171-188.
- 6 World Health Organization Global action plan on antimicrobial resistance <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/864486/retrieve> 2015. 28 p.
- 7 Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis. 2009; V.48, №1. P. 1-12.
- 8 David M.Z., Dryden M., Gottlieb T., Tattevin P., Gould I.M. Recently approved antibacterials for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other Gram-positive pathogens: The shock of the new. Int. J. Antimicrob. Agents. 2017;50:303-307.
- 9 White B.P., Barber K.E., Stover K.R. Ceftaroline for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J. Health Syst. Pharm. 2017;74:201-208.
- 10 Koulenti D., Xu E., Mok I., Song A., Karageorgopoulos D. E., Armaganidis A., Lipman J., Tsiodras S. Novel Antibiotics for Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. Microorganisms 2019 Aug; 7(8): 270.
- 11 Vinogradova A.G., Kuz'menkov A.Ju. Prakticheskoe primenenie AMRmap: jelementy podhoda «ot obshhego k chastnomu» na primere *Klebsiella pneumoniae*. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2019;21(2):181-186.
- 12 Russo A, Giuliano S, Ceccarelli G. Comparison of septic shock due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* or *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit patients. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(6):e02562-17.
- 13 Freire MP, Villela Soares Oshiro IC, Bonazzi PR. Surveillance culture for multidrug-resistant gram-negative bacteria: performance in liver transplant recipients. Infect Control. 2017. V. 45, № 3. P.40-44.
- 14 Kozlova N.S., Barancevich N.E, Barancevich E.P. Chuvstvitel'nost' k antibiotikam shtammov *Klebsiella pneumoniae*, vydelennyh v mnogoprofil'nom stacionare. Infekcija i immunitet. 2018;8(1):79- 84.
- 15 Timothy J. Foster Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects..FEMS Microbiology Reviews. 2017. V. 41, № 3. P. 430-449.
- 16.Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., Townsend, S. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. Medchemcomm. 2019. 10, 1231-1241.

17 Anuj, S. A., Gajera, H. P., Hirpara, D. G., and Golakiya, B. A. Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nanosilver. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019. 127, P. 208–216.

18 Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect.* 2018. V.18, № 3. P. 318-327.

19 Joean O., Thielel T., Schütz K., Schwerk N., Sedlacek L., Kalsdorf B. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a report of cosmopolitan microbial migration and an analysis of best management practices. *Infectious Diseases.* 2020. V.20. P. 678-685.

20 Camacho, E., Chrissian, C., Cordero, R. J. B., Liporagi-Lopes, L., Stark, R. E., Casadevall, A. N-acetylglucosamine affects *Cryptococcus neoformans* cell-wall composition and melanin architecture. *Microbiology* 2017. V.163, P. 1540–1556.

21 Chowdhary A, Sharma C, Meis J.F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):e1006290.

22 Luepke KH, Mohr JF. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017. V.15, № 5. P. 425–433.

23 Livermore D.M. The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection* 2004. V. 10, № 4. P. 1-9.

24 Talbot G.H., Jezek A, Murray B.E., Jones R. N., Ebricht R. H, Nau G. J. Infectious Diseases Society of America. The 10×'20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis.* 2019. V.18; № 1. P. 1-11.

25 Terreni M., Taccani M., Pregnolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives *Molecules* 2021, V.26, № 9. P. 2671.

26 Hurst P. J., Morris M. A., Graham A. A., Nowick J. S., Patterson. Visualizing Teixobactin Supramolecular Assemblies and Cell Wall Damage in *B. subtilis* Using CryoEM. *ACS Omega.* 2021. V.6. № 41, P. 27412-27417.

27 Kuvarina A. E. Mikromicety (otdel Ascomycota porjadki Eurotiales i Hypocreales) s antigribnoj aktivnost'ju i otbor producenta antibiotikov-peptaidolov Diss. na sois. uch. stepeni kand. biol. nauk M. 2016. 181 s.

28 Horak I., Engelbrecht G., Jansen van Rensburg P.J., Claassens S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides *Journal of Applied Microbiology.* 2019. V.127, № 2. P. 326-343.

29 Behie S.W., Bonet B., Zacharia M., McClung D.J. Traxler M.F. Molecules to Ecosystems: Actinomycete Natural Products In situ *Front. Microbiol.*, 17 January 2017 (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02149>).

30 Trenin A. S. Metodologija poiska novyh antibiotikov:sostojanie i perspektivy. *Antibiotiki i himioterapija.* 2015. T.60. S. 7-8.

31 Ghai, R., Mizuno, C. M., Picazo, A., Camacho, A., and Rodriguez-Valera, F. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Mol. Ecol.* 2014. V.23. P. 6073–6090 (doi: 10.1111/mec.12985).

32 Machavariani N. G., Terehova L. P. Biologicheski aktivnye soedinenija, obrazuemye mikroorganizmami-jendofitami . *Antibiotiki i himioterapija.* 2014. V.59. P. 5-6.

33 Gohain A. Gogoi A. Debnath R. Antimicrobial biosynthetic potential and genetic diversity of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants. *FEMS Microbiology Letters.* 2015. 362, no. 19 fmv158.

34 Bore, E.k.; Halicki, S.; Kuzyakov, Y.; Dippold, M.A. Structural and physiological adaptations of soil microorganisms to freezing revealed by position-specific labeling and compound-specific <sup>13</sup>C analysis. *Biogeochemistry.* 2019. V.143. P. 207–219.

35 Masand M., Jose P. A., Menghani E., Robinson S. Jebakumar D. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015. V.31, № 12. P. 1863-1875.

36 Matsumoto A., Takahashi Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J Antibiot (Tokyo).* 2017. V. 70, № 5. P. 514-519.



- 37 Sharma H., Rai A.K., Dahiya D., Chettri R., Nigam P.S. Exploring endophytes for in vitro synthesis of bioactive compounds similar to metabolites produced in vivo by host plants. *AIMS Microbiol.* 2021. V. 7, № 2. P.175-199.
- 38 Roy S. Biotechnological Significance of Endophytic Actinobacteria an Intensive and Emerging Pursuance. *Biotech. Microbiol.* 2018. V. 9, № 4. P. 72-74.
- 39 Wang W., Tsuneda A., Gibas C.F., Currah R.S. Cryptosporiopsis species isolated from the roots of aspen in central Alberta: identification, morphology, and interactions with the host, in vitro. *Canadian Journal of Botany.* 2007.V. 85, № 12.
- 40 Fidan O., Zhan J. Discovery and engineering of an endophytic *Pseudomonas* strain from *Taxus chinensis* for efficient production of zeaxanthin diglucoside. *J. of Biological Engineering.* 2019. V.13, № 66.
- 41 Moreno E., Varughese T., Spadafora C., Arnold A.E., Coley P.D., Kursar T.A., Gerwick W.H., Cubilla-Rios L. Chemical constituents of the new endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and their anti-parasitic activity. *J Antibiot.* 2011. V. 6, № 6. P.835-840.
- 42 Pathak K.V., Keharia H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. *Biotech.* 2014. V. 4, № 3. P. 283–295 (doi: 10.1007/s13205-013-0151-3).
- 43 Christina A., Christopher V., Bhore S.J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacogn Rev.* 2013. V.7, № 13. P. 11–16 (doi: 10.4103/0973-7847.112833).
- 44 Castillo U.F., Strobel G.A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robison R., Condrón M.A.M., Teplow D.B., Stevens D., Yaver D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology.* 2002. V.148. P. 2675–2685.
- 45 Castillo U.F., Strobel G.A., Mullenberg K., Condrón M.M., Teplow D.B., Folgiano V., Gallo M., Ferracane R., Mannina L., Viel S., Codde M., Robison R., Porter H., Jensen J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 296–300.
- 46 Christina A., Christopher V., Bhore S.J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. *Phcog Rev.* 2013. V.7. P. 11-16.
- 47 Taechowisan T., Lu C.H., Shen Y.M., Lumyong S. Antitumor activity of 4-aryl coumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. *J Cancer Res Trer.* 2007. V. 3. P. 86–91.
- 48 Yu Z., Zhao L.-X., Jiang C.L., Duan Y., Wong L., Carver K.C., Shuler L.A., Shen B. Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. *J Antibiot.* 2011. V.64. P.159–162.
- 49 Kim N., Shin J.C., Kim W., Hwang B.Y., Kim B.S., Hong Y.S., Lee D. Cytotoxic 6-alkylsalicylic acids from the endophytic *Streptomyces laceyi*. *J Antibiot.* 2006. V. 59. P.797–800.
- 50 Antoraz S., Santamaría R.I., Díaz M., Sanz D., Rodríguez H. Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Front. Microbiol.* 2015 (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00461>).
- 51 Quinn G.A., Banat A.M., Abdelhameed A.M., Banat I.M. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *J Med Microbiol.* 2020. V.69, № 8. P. 1040-1048 (doi: 10.1099/jmm.0.001232).
- 52 Lu C.H., Shen Y.M. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. *J Antibiot.* 2007. V. 60. P. 649-653.
- 53 Usmanova A.D., Ignatova L.V., Omirbekova A.A., Brazhnikova Y.V., Egamberdieva D.R., Sydykbekova R.K., Sabyrzhan T.B. Diversity of endophytic microorganisms of plants of Kazakhstan and their biological features. *Vestnik KazNU. Serija jekolog.* V. 69, № 4. P. 73-80.
- 54 Joseph B., Priya R.M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect. *J. of Biochemistry and Molecular Biology.* 2011. V.1, № 3. P. 291-309.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.27.17

Г.Т.ДЖАКИБАЕВА, О.Н.ШЕМШУРА, Д.А.ТЛЕУБЕКОВА  
ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, г. Алматы,  
Казахстан

**ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ  
ХЛЕБОПЕКАРНЫХ И ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО  
ХРАНЕНИЯ**

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.03

**Аннотация**

В работе представлены результаты проверки жизнеспособности и активности хлебопекарных и винных дрожжей, хранящихся разными способами в коллекции научно-производственного Центра микробиологии и вирусологии. Все исследуемые штаммы хлебопекарных дрожжей, за исключением *Schizosaccharomyces pombe*, в разной степени сохранили свою активность после длительного хранения. Наибольшая подъемная сила наблюдалась у культур *Saccharomyces cerevisiae* Паса Щелковская и *Saccharomyces cerevisiae* Паса «Сочи Б» при хранении под минеральным маслом.

Из всех видов хранения наилучшими для винных дрожжей являются методы пересева и хранения в 10% растворе глицерина при низких температурах. При этих способах хранения сохраняются высокая жизнеспособность и бродительная активность. При хранении под минеральным маслом активность дрожжей снижается.

**Ключевые слова:** коллекция, методы хранения, жизнеспособность, активность, дрожжи.

В коллекции научно-производственного Центра микробиологии и вирусологии поддерживаются культуры микроорганизмов, относящиеся к различным систематическим группам, перспективные как для научных исследований, так и для промышленных целей. Большую группу промышленно-ценных микроорганизмов составляют дрожжи [1].

На протяжении тысячелетий люди используют дрожжи для ферментации и выпечки. О существовании дрожжей знали еще древние египтяне, применяя их в пивоварении и выпечке хлеба. Современная пищевая промышленность широко использует различные виды дрожжей для производства высококачественных продуктов.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются основным действующим элементом в процессах изготовления вина [2]. Существует множество рас этих дрожжей и у каждой из них свои особенности. Формирование высоких вкусовых и ароматических свойств вина зависит не только от качества перерабатываемых плодов и ягод, но и в значительной мере - от жизнедеятельности дрожжей, принимающих участие в брожении. Высококачественные вина можно получить только с участием хорошо подобранных, отселекционированных дрожжей.

Известно, что активность дрожжей определяется бродительной и спиртообразующей способностью, усвоением азотистых веществ и сахаров, спирто- и кислотовыносливостью. На активность дрожжей влияют также концентрация

сахаров и этилового спирта, углекислый газ, давление, высушивание, антисептики и др. [3]. Однако при хранении штаммы довольно часто теряют свои первоначальные свойства, в связи с чем, поддержание и сохранение дрожжевых культур в течение длительного времени без утраты их полезных качеств представляет первостепенную важность [4].

### Материалы и методы исследований

Объектами исследования являлись 13 винных дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae* (vini) № Рислинг 23, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Кахури-Кахетинская, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Урюк, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Егерь 1, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Прикумская 123/3, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Сливовая 21, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)№Ш-7, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Мускат (68)16, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Аппорт 199, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Яблочные 2(2), *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №18, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №19, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №20 и 7 хлебопекарных дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae* №Раса 14, *Saccharomyces cerevisiae* Мутант №9, *Saccharomyces cerevisiae* №А-21, *Saccharomyces cerevisiae* Раса Киргизская, *Saccharomyces cerevisiae* Раса «Сочи Б», *Saccharomyces cerevisiae* Раса Щелковская, *Schizosaccharomyces pombe*.

Культуры дрожжей на хранение закладывали 3 способами: методом пересева, хранение под вазелиновым маслом и в 10% растворе глицерина при низких температурах. Культуры дрожжей пересевали на скошенную питательную среду Ридера, культивировали в течение 2 суток при  $t=30^{\circ}\text{C}$ . После истечения срока инкубации пробирки с выросшей культурой заливали стерильным вазелиновым маслом и хранили при комнатной температуре. С 2-суточных культур винных дрожжей делали смыв 10% раствором глицерина. Готовую суспензию объемом 1 мл заливали в криопробирки. Хранили в холодильнике при  $t=-18-20^{\circ}\text{C}$ .

Жизнеспособность клеток определяли по интенсивности роста на агаризованной питательной среде следующим образом: культуры, хранящиеся методом пересева, под минеральным маслом и в 10% растворе глицерина при низких температурах пересевали на скошенную питательную среду Риддер и выращивали в течение 2-суток в термостате при температуре  $28^{\circ}\text{C}$ .

Исследования по определению бродительной активности проводились в лабораторных условиях по общепринятым заводским методам [5]. Дрожжевая разводка готовилась в равных условиях на пастеризованных яблочном и виноградном соках. Для брожения вносили двухсуточную культуру дрожжей в количестве 2%. Сбраживали яблочный и виноградный соки, содержащие 10 г/100 см<sup>3</sup> сахара, при температуре  $35^{\circ}\text{C}$ .

Определение подъемной силы дрожжей. В термостат, предварительно разогретый до температуры  $35^{\circ}\text{C}$ , помещали на 2 часа 7 г пшеничной муки, 10–15 мл водного раствора хлорида натрия с массовой долей 2,5%, мерный цилиндр с водопроводной водой, фарфоровую чашку. От средней пробы отбирали и взвешивали по 0,31 г хлебопекарных дрожжей, переносили их в фарфоровую чашку, приливали 4,78 мл водного раствора хлорида натрия до получения однородной суспензии. К полученной суспензии добавляли по 7 г пшеничной муки, тщательно перемешивали и придавали полученному тесту шарообразную форму. Полученное тесто помещали в цилиндрическую емкость с водопроводной водой, нагретой до температуры  $35^{\circ}\text{C}$ , после чего емкость помещали в термостат с температурой  $35^{\circ}\text{C}$ .

Показатель «подъемная сила дрожжей» равен периоду времени в минутах, прошедшему с момента опускания теста в емкость до его всплытия, умноженному на коэффициент 3,5.

### Результаты и обсуждение

Проведена оценка жизнеспособности хлебопекарных дрожжей после длительного хранения. Объектами изучения служили следующие штаммы: *Saccharomyces cerevisiae* Паса 14, *Saccharomyces cerevisiae* Мутант №9, *Saccharomyces cerevisiae* №А-21, *Saccharomyces cerevisiae* Паса Киргизская, *Saccharomyces cerevisiae* Паса «Сочи Б», *Saccharomyces cerevisiae* Паса Щелковская, *Schizosaccharomyces pombe*.

При проверке жизнеспособности хлебопекарных дрожжей результаты исследований показали, что при хранении методом пересева у всех культур выживаемость лучше, чем при остальных методах хранения (таблица 1).

Таблица 1 - Жизнеспособность хлебопекарных дрожжей при разных способах хранения

Название культур	Способ хранения		
	методом пересева	под минеральным маслом	в 10% р-ре глицерина при низких температурах
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Паса 14	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> №А-21	+++	+++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Мутант №9	+++	++	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Паса Киргизская	+++	++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Паса «Сочи Б»	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Паса Щелковская	+++	+	++
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+++	+	+
Примечание: +++ хороший рост, ++ средний рост, + слабый рост			

При хранении в 10% растворе глицерина при низких температурах культуры показали хороший и средний рост и лишь два штамма слабо росли на питательной среде. Хуже жизнеспособность хлебопекарных дрожжей сохраняется при хранении под минеральным маслом: у четырех штаммов наблюдался слабый рост, у двух – средний и только один штамм показал хороший рост.

Одинаковую выживаемость при всех трех методах хранения показали две культуры: *Saccharomyces cerevisiae* №А-21, *Saccharomyces cerevisiae* Паса Киргизская.

На следующем этапе была изучена биологическая активность хлебопекарных дрожжей после длительного хранения разными способами. Результаты представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что все исследуемые штаммы хлебопекарных дрожжей, за исключением *Schizosaccharomyces pombe*, в разной степени сохранили свою активность после длительного хранения. Наибольшая подъемная сила наблюдалась у культур *Saccharomyces cerevisiae* Паса Щелковская и *Saccharomyces cerevisiae* Паса «Сочи Б» при хранении под минеральным маслом – 77 мин и 84 мин, соответственно. У остальных культур хлебопекарных дрожжей подъемная сила была ниже. Наименьшую активность показал штамм *Saccharomyces cerevisiae* Паса Киргизская после хранения под минеральным маслом и в 10% растворе глицерина – 161 и 263 мин.

Таблица 2 - Активность хлебопекарных дрожжей после длительного хранения разными методами

Название культур	Пересев		Минеральное масло		10% р-р глицерина	
	время всплытия, мин	подъемная сила дрожжей, мин	время всплытия, мин	подъемная сила дрожжей, мин	время всплытия, мин	подъемная сила дрожжей, мин
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Раса 14	50	175	30	105	34	119
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> А-21	34	119	32	112	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Мутант №9	47	165	33	116	35	123
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Раса Киргизская	38	133	46	161	75	263
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Раса Щелковская	40	140	22	77	40	140
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Раса Сочи Б	31	109	24	84	35	123
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-		-		-	

Изучена жизнеспособность винных дрожжей, заложенных на длительное хранение разными способами (таблица 3).

Результаты исследования показали, что из 13 штаммов 12 имели хороший рост при хранении методом пересева, а культура *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Прикумская 123/3 – слабый рост. При хранении под минеральным маслом у 5 культур была хорошая выживаемость, в то время как у рас дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №20, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Рислинг №23, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Егерь 1, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Урюк, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Слиловая 21, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Ш-7, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Аппорт 199 – слабая. При хранении в 10% растворе глицерина при низких температурах у 6 культур винных дрожжей наблюдался хороший рост, у остальных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Ш-7, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Кахури-Кахетинская, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Урюк, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Прикумская 123/3, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Аппорт 199, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Яблочные 2(2), *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 комплекс №19 – средний рост. Из результатов исследований видно, что все используемые нами методы сохраняют штаммы винных дрожжей в стабильно жизнеспособном состоянии.

Таблица 3 - Выживаемость винных дрожжей при разных способах хранения

Название культур	Способ хранения		
	Метод пересева	Под минеральным маслом	10% р-р глицерина при низких температурах
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Рислинг №23	+++	+	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Кахури-Кახетинская	+++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Урюк	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Егерь 1	+++	+	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Прикумская 123/3	+	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Сливовая 21	+++	+	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Ш-7	++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Мускат (68)16	+++	++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Аппорт 199	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Яблочные 2(2)	+++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №18	+++	+++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №19	+++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 комплекс №20	+++	+	+++
Примечание +++ хороший рост, ++ средний рост, + слабый рост, - нет роста			

Известно, что активность дрожжей определяется бродильной и спиртообразующей способностью, усвоением азотистых веществ и сахаров, спирто- и кислотовыносливостью.

Нами проведены исследования по определению бродильной активности винных дрожжей после длительного хранения. Результаты представлены в таблице 4.

Из представленных данных таблицы 4 видно, что штамм *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Рислинг №23, хранящийся методом пересева, и штамм *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Мускат (68)16 при всех трех способах хранения обладали высокой бродильной активностью. При этом выпадаемый осадок имел зернистую структуру, что способствовало быстрому осветлению сброженного виноматериала. Менее активными были расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Кахури-Кახетинская и *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Ш-7, содержание спирта при их культивировании составило 3,5–3,8 об. %, но при этом окраска полученного вина была более интенсивной.

Таблица 4 - Характеристика бродильной активности винных дрожжей

Название культур	Использование	Методы хранения			Показатели	
		спирт, об. %			продолжительность брожения, сут.	осадок
		1	2	3		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Рислинг №23	Виноградное виноделие для сухих вин	5	3,8	4	7	Крупно-зернистый
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Кахури-Кахетинская	Виноградное виноделие для сухих вин	3,8	3,5	3	7	Хорошо сформирован, прикреплен к стенкам (зернистый)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Егерь 1	Плодово-ягодное виноделие	1,8	1,5	1,8	7	гладкий
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Прикумская 123/3	Плодово-ягодное виноделие	1	0,8	0,5	7	гладкий
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Урюк	Плодово-ягодное виноделие	1	0,8	0,6	7	гладкий
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Ш-7	Для получения шампанского	3,5	3,5	3,5	7	Крупно-зернистый
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Мускат (68)16	Виноградное виноделие	5,5	5,5	5,2	7	Хорошо сформирован, прикреплен к стенкам (зернистый)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Яблочные 2(2)	Плодово-ягодное виноделие	1	3,5	3,5	7	Крупно-зернистый
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Апорт 199	Плодово-ягодное виноделие	0,8	0,8	0,8	7	Гомогенный, плохо сформирован
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)Сливовая 21	Плодово-ягодное виноделие	0,8	0,7	0,8	7	Хорошо сформирован
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)комплекс №18	Виноградное виноделие	1	1,2	0,8	7	гладкий
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)комплекс №19	Виноградное виноделие	0,7	0,8	0,8	7	гладкий
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini)комплекс №20	Виноградное виноделие	4,2	4,2	5	7	гладкий

Примечание: 1 – метод пересева; 2 – под минеральным маслом; 3 – в 10% р-ре глицерина при низких температурах

При культивировании штамма *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №20 содержание спирта было высоким и составляло 4,2–5 об. %, однако образуемый осадок имел гладкую структуру. Остальные расы дрожжей также имели пылевидную структуру осадка.

Из представленных культур слабое брожение наблюдалось у штаммов *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Аппорт 199, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Прикумская 123/3, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №18 и *Saccharomyces cerevisiae* (vini)2 комплекс №19.

Таким образом, из всех видов хранения наилучшим для винных дрожжей является метод пересева и хранение в 10% растворе глицерина при низких температурах. При этих способах хранения наблюдается высокая жизнеспособность и бродильная активность. При хранении под минеральным маслом активность дрожжей была несколько ниже.

### Литература:

- 1 Лукашева Л.М. Длительное хранение культур микроорганизмов в коллекции //Актуальные проблемы микробиологии и вирусологии. –Алматы, 2009. –С.54.
- 2 Адекенов С.М. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии в Республике Казахстан //Биотехнология. Теория и практика. -2001. - №1-2. С.5-15.
- 3 Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология. –М.:ИЦ «Академия», 2007. -300 с.
- 4 Bidan P.E. Les schizosaccharomyces en oenologie. –Bull, de 101 V., 1994, V.47, N 523.
- 5 Бурьян Н.И. Сравнительное изучение различных методов хранения винных дрожжей // Труды ВНИИВиВ «Магарач». – 1960. Т.9. –С.53-81.

Г.Т.ДЖАКИБАЕВА, О.Н.ШЕМШУРА, Д.А.ТЛЕУБЕКОВА  
«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,  
Алматы қ. Қазақстан

## ҰЗАҚ УАҚЫТ САҚТАҒАННАН КЕЙІН НАУБАЙХАНАЛЫҚ ЖӘНЕ ШАРАП АШЫТҚЫЛАРЫНЫҢ ӨМІРШЕҢДІГІ МЕН БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІН БАҒАЛАУ

### Түйін

Жұмыста Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығының коллекциясында әртүрлі тәсілдермен сақталған наубайхана мен шарап ашытқысының өміршеңдігі мен белсенділігін тексеру нәтижелері ұсынылған. *Schizosaccharomyces pombe* қоспағанда, барлық зерттелген ашытқы штамдары ұзақ уақыт сақталғаннан кейін әртүрлі дәрежеде белсенді болды. Ең үлкен көтеру күші *Saccharomyces cerevisiae* мәдениеттерінде байқалды Щелковская жарысы және *Saccharomyces cerevisiae* "Сочи Б" жарысы минералды май астында сақталған кезде.

Барлық сақтау түрлерінің ішінде шарап ашытқысы үшін ең жақсы әдіс-төмен температурада глицериннің 10% ерітіндісінде қайта себу және сақтау әдістері. Бұл сақтау әдістерімен жоғары өміршеңдік пен ашыту белсенділігі сақталады. Минералды май астында сақталған кезде ашытқы белсенділігі төмендейді.

**Кілтті сөздер:** жинау, сақтау әдістері, өміршеңдік, белсенділік, ашытқы.



IRSTI: 34.27.17

G.T.DZHAKIBAEVA, O.N.SHEMSHURA, D.A.TLEUBEKOVA  
LLP «Research and Production Center of Microbiology and Virology», Almaty,  
Kazakhstan

## EVALUATION OF VIABILITY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF BAKERY AND WINE YEAST AFTER LONG-TERM PRESERVATION

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.03

### Abstract

The article presents the results of testing the viability and activity of baker's and wine yeast stored in various ways in the collection of the Research and Production Center of Microbiology and Virology. All observed strains of baker's yeast except of *Schizosaccharomyces pombe*, retained their activity to varying degrees after long-term preservation. The highest lifting force was observed in cultures of *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Schelkovskaya and *Saccharomyces cerevisiae* Rasa «Sochi B» when preserved with mineral oil.

From the all preservation methods, the best one for wine yeast is subculture and storage in a 10% glycerol solution at low temperatures. With these preservation methods, high viability and fermentation activity are maintained. When stored with mineral oil, yeast activity is reduced.

**Keywords:** collection, preservation methods, viability, activity, yeast.

The collection at the Research and Production Center of Microbiology and Virology maintains cultures of microorganisms belonging to various systematic groups, promising both for scientific research and for industrial purposes. A large group of industrially valuable microorganisms are yeasts. [1].

For thousands of years, people apply yeast for fermentation and baking. The ancient Egyptians knew about the existence of yeast, using it in brewing and baking bread. The modern food industry makes extensive application of various types of yeast to produce high quality products. The *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain is the main active element in wine making processes. [2]. There are many races of this yeast and each of them has its own characteristics. The formation of high taste and aromatic properties of wine depends not only on the quality of the processed fruits and berries, but also to a large extent on the vital activity of the yeast involved in fermentation. High-quality wines can only be obtained with the participation of well-chosen, selected yeasts.

It is known that the activity of yeast is determined by the fermentation and alcohol-forming ability, the assimilation of nitrogenous substances and sugars, alcohol and acid tolerance. The activity of yeast is also affected by the concentration of sugars and ethyl alcohol, carbon dioxide, pressure, drying, antiseptics and other. [3]. However, during storage, strains quite often lose their primary properties, and therefore, maintaining and preserving yeast cultures for a long time without losing their essentials qualities is of paramount importance. [4].

### Materials and methods of research

The objects of the research were 13 wine yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* (vini) № Risling 23, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Kahuri -Kakhetinskaya, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Uryuk, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Eger 1, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Prikumskaya 123/3, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Slivovaya 21, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)№Sh-7, *Saccharomyces cerevisiae* (vini)Muskat (68)16, *Saccharomyces*

*cerevisiae (vini)*Aport 199, *Saccharomyces cerevisiae (vini)*Yablochnye 2(2), *Saccharomyces cerevisiae (vini)*2 complex №18, *Saccharomyces cerevisiae (vini)*2 complex №19, *Saccharomyces cerevisiae (vini)*2 complex №20 and 7 baker's yeast: *Saccharomyces cerevisiae* №Rasa 14, *Saccharomyces cerevisiae* Mutant №9, *Saccharomyces cerevisiae* №A-21, *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Kirgizskaya, *Saccharomyces cerevisiae* Rasa «Sochi B», *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Shelkovskaya, *Schizosaccharomyces pombe*.

Yeast cultures were planted in 3 ways: by reseeded, preservation with Vaseline oil, and in 10% glycerol solution at low temperatures. Yeast cultures were inoculated on the slanted nutrient medium of the Reader, cultivated for 2 days at  $t=30^{\circ}\text{C}$ . After the expiration of the incubation period, the tubes with the grown culture were filled with sterile vaseline oil and stored at room temperature. From 2-day cultures of wine yeast, a wash was done with a 10% solution of glycerol. The prepared suspension with a volume of 1 ml was poured into cryovials. Stored at refrigerator with  $t=-18-20^{\circ}\text{C}$ .

Cell viability was determined by the intensity of growth on an agar nutrient medium as follows: cultures stored by reseeded under mineral oil and in 10% glycerol solution at low temperatures were subcultured into a slanted Ridder nutrient medium and grown for 2 days in a thermostat at a temperature of  $28^{\circ}\text{C}$ .

Studies to determine fermentation activity were carried out at laboratory conditions according to generally accepted factory methods [5]. Yeast wiring was prepared under equal conditions on pasteurized apple and grape juices. For fermentation, a two-day yeast culture was added in an amount of 2%. Apple and grape juices containing 10 g/100 cm<sup>3</sup> of sugar were fermented at a temperature of  $35^{\circ}\text{C}$ .

Determination of the lifting power of yeast. 7 g of wheat flour, 10-15 ml of an aqueous solution of sodium chloride with a mass fraction of 2.5%, a measuring cylinder with tap water, and a porcelain cup were placed in a thermostat, preheated to a temperature of  $35^{\circ}\text{C}$ , for 2 hours. From the average sample, 0.31 g of baker's yeast was taken and weighed, transferred to a porcelain cup, 4.78 ml of an aqueous solution of sodium chloride was added until a homogeneous suspension was obtained. 7 g of wheat flour were added to the resulting suspension, thoroughly mixed, and the resulting dough was spherical. The resulting dough was placed in a cylindrical container with tap water heated to a temperature of  $35^{\circ}\text{C}$ , after which the container was placed in a thermostat with a temperature of  $35^{\circ}\text{C}$ .

Yeast lift is equal to the period of time in minutes from the moment the dough is lowered into the container until it rises, multiplied by a factor of 3.5

### Results and discussion

An assessment of the viability of baker's yeast after long-term storage was carried out. The following strains served as the objects of study: *Saccharomyces cerevisiae* Rasa 14, *Saccharomyces cerevisiae* Mutant №9, *Saccharomyces cerevisiae* №A-21, *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Kirgizskaya, *Saccharomyces cerevisiae* Rasa «Sochi B », *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Shelkovskaya, *Schizosaccharomyces pombe*.

During the examination of baker's yeast viability, the results of the research showed when preservation by the subculture method, all cultures have a better survival rate than with other storage methods (table 1).

Table 1 - Viability of baker's yeast with different preservation methods

Culture name	Preservation method		
	Culture method	With mineral oil	in 10% solution of glycerin at low temperatures
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa 14	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> №A-21	+++	+++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mutant №9	+++	++	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa Kirgizskaya	+++	++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa «Sochi B»	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa Shelkovskaya	+++	+	++
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+++	+	+
Notes: +++ good growth, ++ average growth, + weak growth			

When stored in a 10% glycerol solution at low temperatures, the cultures showed good and medium growth, and only two strains grew weakly on a nutrient medium. Worse, the viability of baker's yeast is preserved when stored under mineral oil: four strains showed poor growth, two had medium growth, and only one strain showed good growth.

Two cultures showed the same survival in all three preservation methods: *Saccharomyces cerevisiae* №A-21, *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Kirgizskaya.

At the next stage, the biological activity of baker's yeast was researched after long-term preservation in various ways. The results are presented in table 2.

It can be seen from the table that all the studied strains of baker's yeast, with the exception of *Schizosaccharomyces pombe*, retained their activity to varying degrees after long-term storage. The highest lifting force was observed in cultures of *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Shelkovskaya and *Saccharomyces cerevisiae* Rasa "Sochi B" when stored with mineral oil - 77 min and 84 min, respectively. The rest of the cultures of baker's yeast had a lower lifting force. The lowest activity was shown by the strain *Saccharomyces cerevisiae* Rasa Kirgizskaya after storage under mineral oil and in 10% glycerol solution - 161 and 263 min.

Table 2 - Activity of baker's yeast after long-term preservation by different methods

Culture name	Cultivation		Mineral oil		10% glycerin solution	
	ascent time, min	lifting force of yeast, min	ascent time, min	lifting force of yeast, min	ascent time, min	lifting force of yeast, min
1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa 14	50	175	30	105	34	119
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> A-21	34	119	32	112	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mutant №9	47	165	33	116	35	123
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa Kirgizskaya	38	133	46	161	75	263

Table 2 continuation

1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa Shelkovskaya	40	140	22	77	40	140
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasa Sochi B	31	109	24	84	35	123
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-		-		-	

During the research was studied the viability of wine yeast stored for long-term preservation in various ways (Table 3).

The results of the research show that out of 13 strains, 12 had good growth during storage by reseeded, and the culture of *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Prikumskaya 123/3 had poor growth. When stored with mineral oil, 5 cultures had good survival, while yeast races *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №20, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Risling №23, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Eger 1, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Uryk, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Slivovaya 21, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Sh-7, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Aport 199 – week. When stored in a 10% glycerol solution at low temperatures, 6 cultures of wine yeast showed good growth, the remaining strains *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Sh-7, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Kahuri-Kakhetinskaya, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Uryk, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Prikumskaya 123/3, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Aport 199, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Yablochnie 2(2), *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №19 – average growth. It can be observed from the research results that all the methods we use keep wine yeast strains in a stable viable state.

Table 3 - Survival of wine yeast with different preservation methods

Culture method	Preservation method		
	Culture method	With mineral oil	in 10% solution of glycerin at low temperatures
1	2	3	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Risling №23	+++	+	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Kahuri Kakhetinskaya	+++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Uryk	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Eger1	+++	+	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Prikumskaya 123/3	+	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Slivovaya 21	+++	+	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Sh-7	++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Muskat (68)16	+++	++	+++

Table 3 continuation

1	2	3	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Aport 199	+++	+	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Yablochnie 2(2)	+++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №18	+++	+++	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №19	+++	+++	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №20	+++	+	+++
Notes: +++ good growth, ++ average growth, + weak growth			

It is known that the activity of yeast is determined by the fermentation and alcohol-forming ability, the assimilation of nitrogenous substances and sugars, alcohol and acid tolerance.

We have carried out studies to determine the fermentation activity of wine yeast after long-term storage. The results are presented in table 4.

From the data presented in Table 4, it can be seen that the strain of *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Risling №23, stored by reseeded, and the strain of *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Muskat (68) 16, with all three storage methods, had high fermentation activity. At the same time, the precipitated had a granular structure, which contributed to the rapid clarification of the fermented wine material. The yeast races *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Kahuri-Kakhetinskaya and *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Sh-7 were less active, the alcohol content during their cultivation was 3.5–3.8 vol. %, but the color of the resulting wine was more intense.

Table 4 - Characteristics of the fermentation activity of wine yeast

Culture name	Application	Preservation methods			Indicators	
		alcohol %			duration of fermentation, days.	precipitation
		1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Risling №23	Grape winemaking for dry wines	5	3,8	4	7	Coarse-grained
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Kahuri Kakhetinskaya	Grape winemaking for dry wines	3,8	3,5	3	7	Well formed, attached to walls (grainy)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Egerl	Fruit and berry winemaking	1,8	1,5	1,8	7	smooth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Prikumskaya 123/3	Fruit and berry winemaking	1	0,8	0,5	7	smooth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Uryk	Fruit and berry winemaking	1	0,8	0,6	7	smooth

1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Sh-7	For champagne making	3,5	3,5	3,5	7	Coarse-grained
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Muskat (68)16	Grape winemaking	5,5	5,5	5,2	7	Well formed, attached to walls (grainy)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Yablochnie 2(2)	Fruit and berry winemaking	1	3,5	3,5	7	Coarse-grained
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Aport 199	Fruit and berry winemaking	0,8	0,8	0,8	7	Homogeneous, poorly formed
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) Slivovaya 21	Fruit and berry winemaking	0,8	0,7	0,8	7	well formed
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №18	Grape winemaking	1	1,2	0,8	7	smooth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) 2 complex №19	Grape winemaking	0,7	0,8	0,8	7	smooth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vini) complex №20	Grape winemaking	4,2	4,2	5	7	smooth
Notes: 1 - reseeding method; 2 - with mineral oil; 3 - in 10% solution of glycerol at low temperatures						

When cultivating the strain *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №20, the alcohol content was high and amounted to 4.2–5 vol. %, however, the formed precipitate had a smooth structure. The rest of the yeast races also had a pulverulent sediment structure.

Of the presented cultures, weak fermentation was observed in strains of *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Aport 199, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) Prikumskaya 123/3, *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №18 and *Saccharomyces cerevisiae* (vini) 2 complex №19.

Thus, of all types of storage, the best method for wine yeast is the method of subculture and storage in a 10% glycerol solution at low temperatures. With these methods of storage, high viability and fermentation activity are observed. Yeast activity was slightly lower when stored under mineral oil.

#### References:

- 1 Lukashova L.M. Dlitelnoe khranenie kultur mikroorganizmov v kollekcii // Aktualnye problemy mikrobiologii i virusologii. –Almaty, 2009. –S.54.
- 2 Adekenov S.M. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy razvitiya biotekhnologii v Respublike Kazakhstan // Biotekhnologiya. Teoriya i praktika. -2001. - №1-2. S.5-15.
- 3 Netrusov A.I., Kotova I.B. Mikrobiologiya. –M.:ICz «Akademiya», 2007. -300 s.
- 4 Bidan P.E. Les schizosaccharomyces en oenologie. –Bull, de 101 V., 1994, V.47, N 523.
- 5 Buryan N.I. Sravnitel'noe izuchenie razlichnykh metodov khraneniya vinnykh drozhzhej // Trudy VNIIViV «Magarach». – 1960. T.9. –S.53-81.

МРНТИ: 62.09.39

Э.Т. ИСМАИЛОВА<sup>1</sup>, А.К.САДАНОВ<sup>1</sup>, О.Н. ШЕМШУРА<sup>1</sup>, А.И.БАЙДАЛИНОВ<sup>1</sup>,  
Д.А.ТЛЕУБЕКОВА<sup>1</sup>, Г.Б. БАЙМАХАНОВА<sup>1</sup>, Г.А.ЖАРМУХАМЕДОВА<sup>2</sup>, Ж.К.  
ЖУМАНОВА<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ТОО "Казахский научно-исследовательский институт плодоовощеводства",  
Алматы, Казахстан

## ФИТОСАНИТАРНЫЙ МОНИТОРИНГ ДИКОПЛОДОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ ЯБЛОНИ СИВЕРСА НА ПОРАЖЕННОСТЬ БОЛЕЗНЯМИ В УСЛОВИЯХ ЮЖНОГО, ЮГО-ВОСТОЧНОГО И ЦЕНТРАЛЬНОГО КАЗАХСТАНА

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.04

### Аннотация

В статье приведены результаты мониторинговых обследований в Южном, Юго-Восточном и Центральном регионах Казахстана диких посадок яблони Сиверса на пораженность болезнями. В ходе проведенных исследований установлено, что в обследованных регионах встречались такие болезни, как парша (*Fusicladium dendriticum*), монилиозная плодовая гниль (*Monilia fructigena*), цитоспороз (*Cytospora capitata*), мучнистая роса яблони (*Podosphaera leucotricha*), ржавчина (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.) и пятнистости различной этиологии. В засушливый 2021 год на дикоплодовых насаждениях проявление парши, монилиозной плодовой гнили, различных видов пятнистостей и ржавчины было слабым. Основной болезнью в 2021 году была мучнистая роса, которая паразитировала на угнетенных засухой деревьях.

**Ключевые слова:** мониторинг, болезни, дикая яблоня Сиверса, фитопатогены, возбудитель

Дикая яблоня Казахстана *Malus sieversii* (Ledeb) M.Roem., являющаяся абorigеном казахстанских плодовых лесов, признана родоначальником яблони *Malus domestica*. В настоящее время генетические ресурсы яблоневого леса являются мировым источником генов устойчивости для селекции плодовых культур. Генофонд казахстанской яблони Сиверса может служить основой для создания зимостойких, засухоустойчивых, устойчивых к болезням сортов. На территории Казахстана рощи яблони Сиверса сосредоточены в основном в Заилийском и Джунгарском Алатау на высоте 2500–3000 м над уровнем моря [1].

На сегодняшний день состояние этого уникального генетического резервата из-за воздействия антропогенного фактора оценивается, как неудовлетворительное. Негативными воздействиями на природные экосистемы, определяющими деградацию плодовых лесов, является механическое разрушение плодовых лесов и их мест обитания в результате хозяйственной деятельности человека. Яблоня Сиверса занесена в Красную книгу Республики Казахстан как вид с сильно сокращающимся ареалом [2].

Согласно Концепции по сохранению и устойчивому использованию биоразнообразия в Республике Казахстан до 2030 года основной задачей было сохранить дикую яблоню *in situ*, разработать комплекс мероприятий, направленных на воспроизводство и повышение продуктивности яблонников. Но недостатком этого проекта являлось то, что в нём не уделялось достаточного внимания биоразнообразию мира вредных насекомых и патогенных микроорганизмов, которые в отдельные годы ставят яблонники на грани выживания и даже гибели [3]. Болезни древесных культур и кустарников вызывают массовое усыхание и

ослабление лесов, кроме того, приводят к гибели отдельных деревьев и целых участков лесных насаждений. Как известно, из ранее проведенных исследований [1,4-6], дикая яблоня поражается различными болезнями, поэтому для нас представлял большой интерес установить фитосанитарное состояние посадок дикоплодовых насаждений яблони Сиверса в настоящее время; выявить доминантные виды заболеваний и в дальнейшем разработать превентивные меры борьбы с использованием экологически безопасных биопрепаратов.

Целью наших исследований явилось проведение фитопатологического обследования дикоплодовых лесов, определение видов болезней дикой яблони Сиверса и изучение фитопатологического состояния её посадок в Казахстане.

### Объекты и методы исследований

Объектом исследования служили культуры микроорганизмов, выделенные с образцов различных органов (плоды, листья, ветки) посадок дикой яблони Сиверса, которые были отобраны в ходе маршрутных обследований в Южном, Юго-Восточном и Центральном регионах Казахстана. Обследование проводили в 2021 году совместно с сотрудниками Казахского научно-исследовательского института плодовоовощеводства (КазНИИП) в период роста и плодоношения яблони. Отбор образцов пораженных органов яблони производили с соблюдением правил отбора и транспортировки биологического материала, исключающих внешнюю контаминацию и обеспечивающих сохранность исходной микрофлоры [8].

Для оценки качественного и количественного состава микробоценозов филлосферы яблони использовали метод смыва и метод накопительных культур [9-11]. Для выделения микроорганизмов использовались селективные питательные среды: РПА, СПА и MRS – для бактерий, КГА – для грибов, Сабуро – для дрожжей, Чапека-Докса – для актиномицетов. Окрашивание бактерий по Граму выполняли по методике, описанной Claus [10]. Морфологию клеток исследовали световой микроскопией фиксированных препаратов [11].

Идентификацию микроорганизмов проводили на основании изучения морфолого-культуральных свойств с использованием соответствующих определителей [12-14].

### Результаты и обсуждение

С целью выявления основных болезней дикой яблони Сиверса нами в 2021 году были проведены фитосанитарные обследования посадок в различных регионах Казахстана. В ходе проведенных обследований осуществлён учет распространенности и вредоносности доминантных видов болезней яблони Сиверса (таблица 1, рисунки 1-3).

Установлено, что в обследованных регионах доминантными видами заболеваний, представляющие опасность для яблони Сиверса, являются следующие виды болезней: парша (*Fusicladium dendriticum*), монилиозная плодовая гниль (*Monilia fructigena*), цитоспороз (*Cytospora capitata*), мучнистая роса яблони (*Podosphaera leucotricha*), ржавчина (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.), пятнистости (*Bacterium cerasi*) различной этиологии.

Основной болезнью, приносящей ущерб диким яблоневым садам, является парша, вызываемая грибом *Venturia inaequalis*. Эта инфекция снижает урожайность плодовых деревьев и ухудшает качество плодов. Установлено, что в 2021 году климатические условия для Казахстана были весьма засушливыми, и поэтому проявление этого заболевания было слабым во всех регионах обследования, а в отдельных насаждениях яблони парша вовсе отсутствовала. Возбудитель данной болезни был выделен с пораженных листьев и плодов в период вегетации деревьев.



Второе место по степени вредоносности занимает мучнистая роса, возбудитель- гриб *Podosphaera leucotricha*. В связи с тем, что возбудитель этой инфекции является облигатным паразитом, её проявление в этот острозасушливый год на угнетённых растениях было значительным. Максимальное поражение отдельных деревьев в Туркестанской и Жамбылской областях доходило до 25%. Возбудитель мучнистой росы был выделен с молодых побегов и листьев яблони.

В период плодоношения были обнаружены плоды яблони, пораженные монилиозной плодовой гнилью (возбудитель *Monilia fructigena Pers.*) Это заболевание в слабой степени было обнаружено в Жонгар-Алатауском заповеднике (Черновское ИУ, Кокжарское ИУ) и Иле-Алатауском заповеднике (Ущелье Солдатское, Аксайское ущелье).

Цитоспороз (возбудитель *Cytospora capitata S.*) встречался во всех регионах обследования на отдельных деревьях в различной степени проявления от 5% до 35%.

Возбудитель цитоспороза был выделен с пораженных веток и стволов яблони.

Признаки поражения ржавчиной (возбудитель *Gymnosporangium juniperinum Mart.*) и другими видами пятнистостей в слабой степени проявлялись на единичных деревьях и особой опасности для растений не представляли (таблица 2).

Такое заболевание, как бактериальный ожог (возбудитель *Erwinia amylovora*), которое является особо вредоносным на культурных посадках яблони, на дикоплодовых насаждениях не обнаружено.

Таблица 1 - Результаты фитосанитарного обследования дикоплодовых насаждений яблони Сиверса на пораженность болезнями, 2021 г.  
Основные болезни дикой яблони

	Место отбора проб	Основные болезни дикой яблони				
		Монилиозная плодовая гниль	Парша	Цитоспоров	Мучнистая роса	Ржавчина
1	2	3	4	5	6	7
ГНПП Жонгар-Алатауский заповедник	Урочище "Осиновый" Кордон «Черная речка»	-	+	++	+	-
	Черновское ИУ	+	-	+	+	-
	Кокжарское ИУ	+	+	-	+	+
	Тополевском ИУ	-	+	+	+	-
	Окрестности г.Текели	-	-	-	-	-
	Окрестности п. Кабанбай	-	-	+	+	-
	Ущелье Солдатское	-	+	-	-	-
	Кузнецова щель (генетический резерватор) Тургенъ.	+	+	++	+	-
	Талды-Булак Маловодненское лесничество	+	++	+	+	-
	Малый Киргизсай	+	-	+	+	+
ГНПП Иле-алатауский заповедник	Аксайское ущелье	-	++	-	+	-
	Ущ.Котур-Булак территория филиала национального парка	-	+	+	+	-
	Каменная щель	-	+	+	+	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
Жамбылская область	Карагауский ГПЗ	+	-	-	++	-
Туркестанская область	Тулькубасский район	-	-	+	++	-
	ГПЗ «Аксу Жабаглы», Пос. Аксу Жабаглы (частное подворье)	+	+	-	-	-
	Сайрам-Угамский ГНПП Саирамский р-н, Манкент	-	+	+	++	-
ГНПП Тарбагай	Пойма реки Уржар	-	+	-	+	+

Примечание:

+++ - сильное проявление болезни (от 30% и более)

++ - среднее проявление болезни (от 5% до 20%)

+ - слабое проявление болезни (от 1% до 5%)

-- отсутствие болезни (0%)

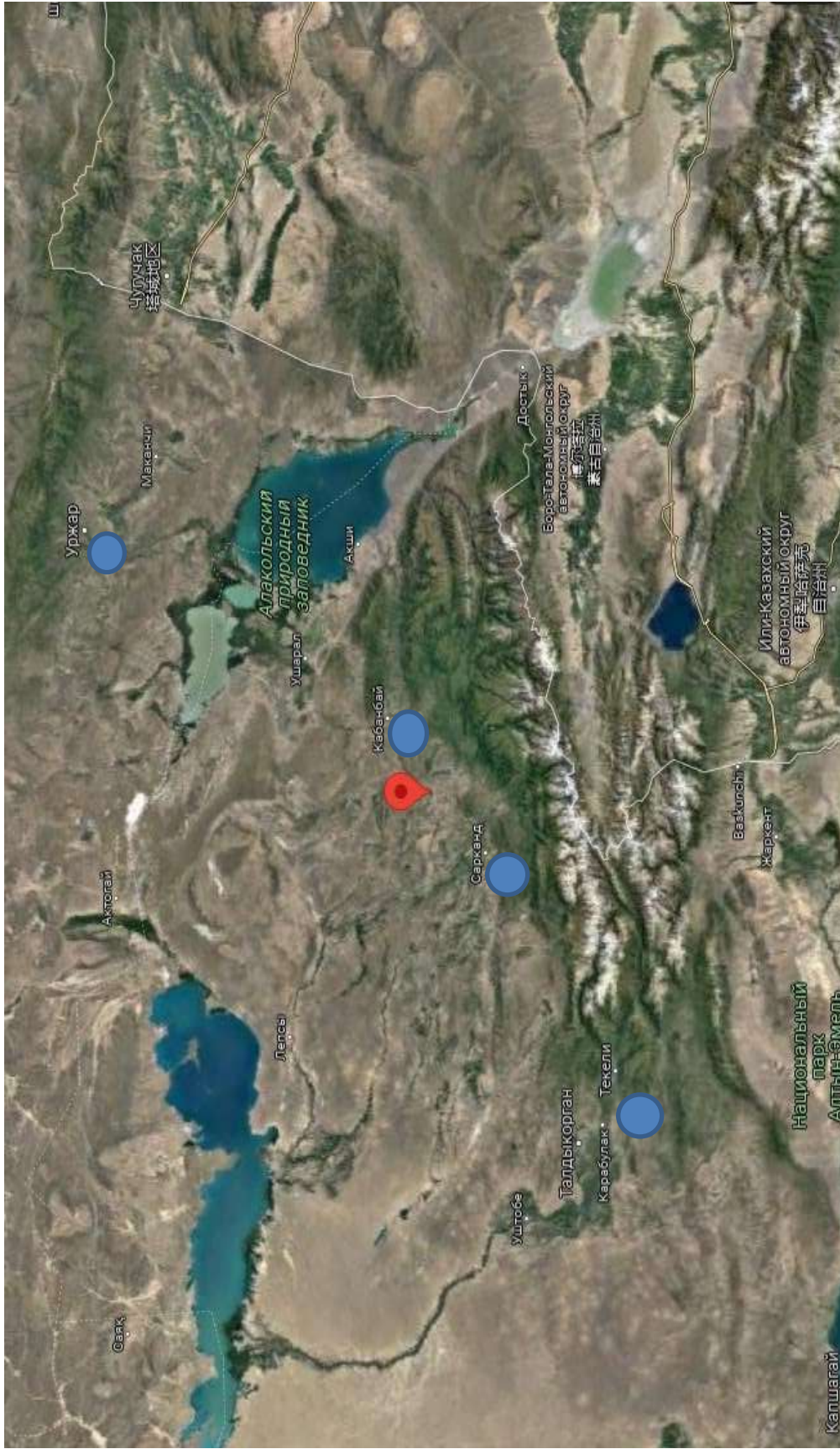


Рисунок 1 - Места проведения обследований на пораженность болезнями яблони Сиверса в Жонгар - Алатауском заповеднике и ГНПП «Тарбагатай»



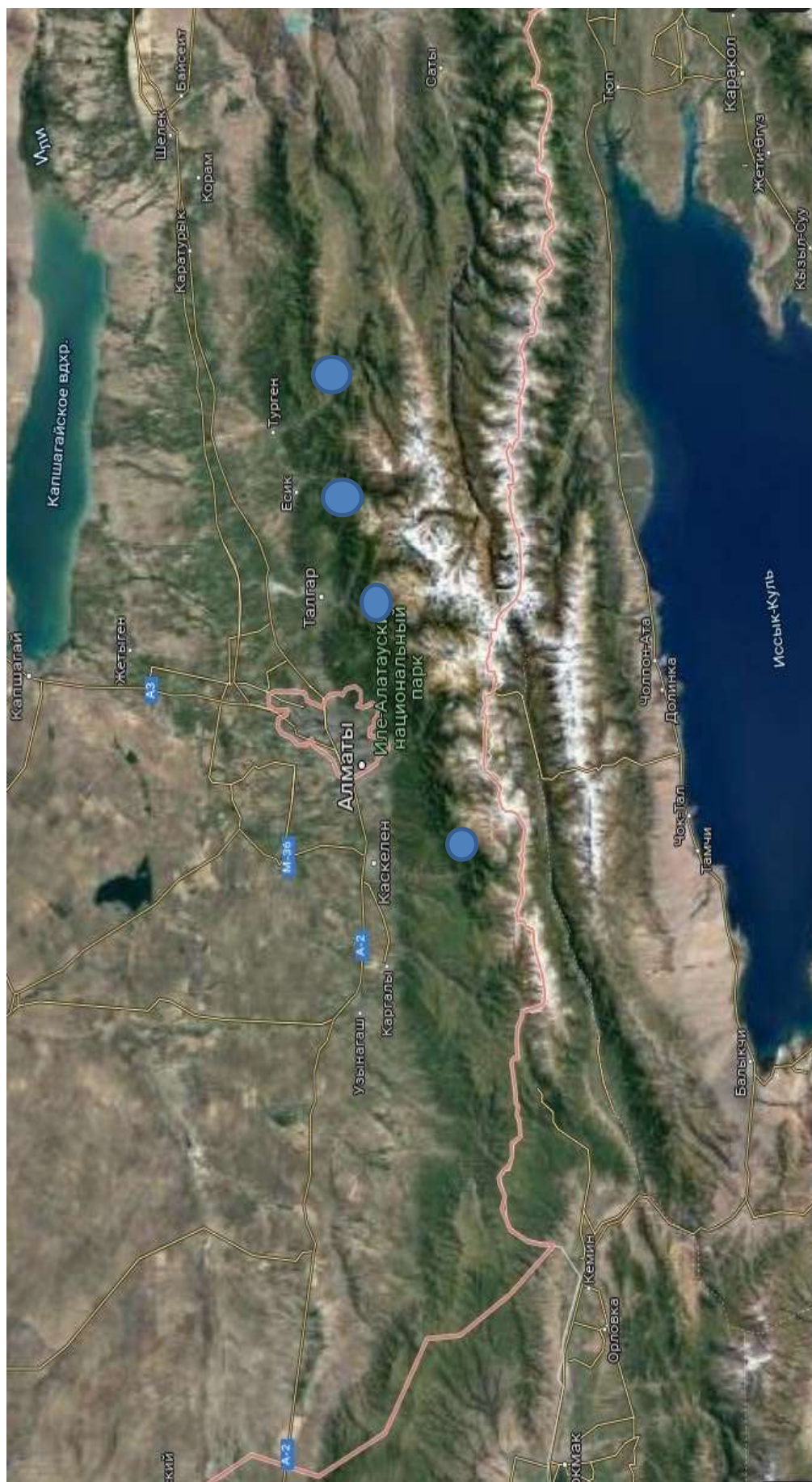


Рисунок 2 – Места проведения обследований на поражение яблоны Сиверса в Иле-Алатауском заповеднике



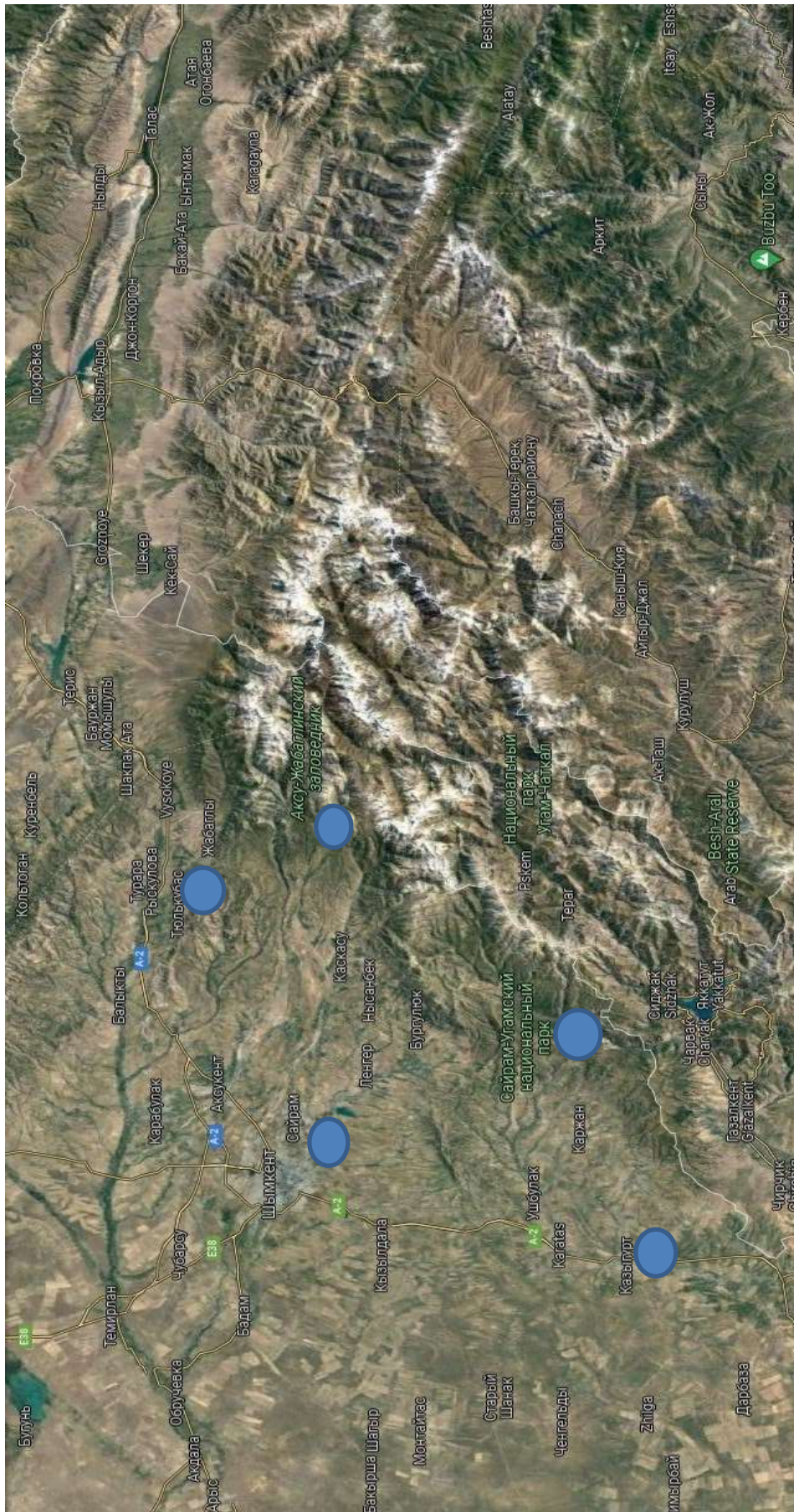










Рисунок 3 – Места проведения обследований на пораженность болезнями яблони Сиверса в Сайрам-Уганском и Аксу-Жабаглинском национальном парках

Таблица 2 – Основные болезни дикой яблони Сиверса

Название болезни	Возбудитель болезни	Органы яблони, откуда был выделен возбудитель	Микроскопическое строение возбудителя болезни	Проявление болезни
1	2	3	4	5
Парша	<i>Venturia inaequalis</i>	Плоды  Листья	 	 



Продолжение таблицы 2

<p>1</p> <p>Мучнистая роса</p>	<p>2</p> <p><i>Rodosphaera leucotricha</i></p>	<p>3</p> <p>Молодые побеги, Листья</p>	<p>4</p> 	<p>5</p> 
<p>Монилиозная гниль</p>	<p><i>Monilia fructigena</i></p>	<p>Плоды</p>		



Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Цитоспороз	<i>Cytospora caritata</i>	Ветки		
Ржавчина	<i>Uromyces juniperinum</i>	Листья		

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что в обследованных регионах Казахстана встречались такие болезни яблони Сиверса, как парша (*Fusicladium dendriticum*), монилиозная плодовая гниль (*Monilia fructigena*), цитоспороз (*Cytospora capitata*), мучнистая роса яблони (*Podosphaera leucotricha*), ржавчина (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.) и пятнистости различной этиологии. В засушливый 2021 год на дикоплодовых насаждениях проявление парши, монилиозной плодовой гнили, различных видов пятнистостей и ржавчины было слабым. Основной болезнью в 2021 году была мучнистая роса, которая паразитировала на угнетенных засухой деревьях.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы КН МОН РК «Эколого-интродукционный анализ коллекционных фондов Государственных ботанических садов и скрининг природной флоры для разработки научно-обоснованных рекомендаций по ассортименту растений для озеленения городов и населенных пунктов разных природных зон Казахстана»

### Литература:

- 1 Джангалиев А. Д. Уникальное и глобальное значение генофонда яблоневых лесов Казахстана. Доклады Национальной академии наук Республики Казахстан, 2007, № 5, с.41–47.
- 2 Красная книга. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. Том 2.: Растения. – Астана.: ТООPrintXXI, 2014. – С.144-145.
- 3 Концепция по сохранению и устойчивому использованию биологического разнообразия Республики Казахстан до 2030 года, Астана, 2015.
- 4 Rakhimova E., Byzova Z., Valieva B., Dernovskaya L. Diversity of microfungi in fruit firests of Ili-Alatau National park (Kazakhstan) // *Phytopathol. Pol.* – Poznan, 2005. – Vol. 35. – P. 203–212.
- 5 Нам Г.А., Рахимова Е.В., Кызметова Л.А. Основные патогенные грибы в плодовых лесах Заилийского Алатау // Проблемы сохранения горного растительного агробιοразнообразия в Казахстане: Сб тезисов Междунар. науч.-практ. конф. – Алматы, 2007. – С. 70–74.
- 6 Рахимова Е.В., Нам Г.А. Микобиота яблони Сиверса в Казахстане // Дикоплодовые леса Казахстана: вопросы сохранения и рационального использования генофонда глобального значения: Сб. тезисов Междунар. научн.-практ. конф. – Алматы, 2012. – С. 76–80.
- 7 Айнабеков М.С., Туреханова Р.М., Иващенко А.А. О сохранении дикой яблони и абрикоса на территории Иле-Алатауского ГНПП // Материалы Международной конференции «Проблемы изучения, сохранения и 27 Яблоня Сиверса в Иле-Алатауском НП: Результаты и перспективы мониторинга рационального использования водных и околородных экосистем», посвященной 80-летию со дня рождения д.б.н. проф. В.П.Митрофанова. Вестник Каз НУ. Серия экологическая. - 2012. №1. – С.238-241.
- 8 Методические указания по мониторингу численности вредителей, сорных растений и развития болезней сельскохозяйственных культур. - Астана, 2004.- 267 с.
- 9 Чумаевская М.А., Матвеева Е.В. Методические указания по изоляции и идентификации фитопатогенных бактерий. – М.: Колос, 1986. – 40 с.
- 10 Claus D.C. A standardized Gram staining procedure // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – Vol. 8. – P. 451-452.
- 11 Klement Z., Rudolph K., Sands D.C. *Methods in phytobacteriology.* – Budapest: Akademiai Kiado, 1990.
- 12 Нетрусов А. И. и др Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 604 с.
- 13 Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. – М.: Мир, 2001. – 468 с.

14 Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2: The Proteobacteria (Part C). – 2nd Ed. – Springer US, 2005. – 1388 p.

Э.Т. ИСМАИЛОВА<sup>1</sup>, А.К. САДАНОВ<sup>1</sup>, О.Н. ШЕМШУРА<sup>1</sup>, А.И. БАЙДАЛИНОВ<sup>1</sup>,  
Д.А.ТЛЕУБЕКОВА<sup>1</sup>, Г.Б. БАЙМАХАНОВА<sup>1</sup>, Г.А. ЖАРМУХАМЕДОВА<sup>2</sup>,  
Ж.К. ЖУМАНОВА<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Қазақ жеміс және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының, Алматы қ.,  
Қазақстан

## ОҢТҮСТІК, ОҢТҮСТІК-ШЫҒЫС ЖӘНЕ ОРТАЛЫҚ ҚАЗАҚСТАН ЖАҒДАЙЫНДАҒЫ СИВЕРС АЛМА ЖАБАЙ ЖЕМІС ӨСІМДЕРІНІҢ АУРУЛАРЫНА ФИТОСАНИТАРЛЫҚ МОНИТОРИНГ

### Түйін

Мақалада Қазақстанның Оңтүстік, Оңтүстік-Шығыс және Орталық аймақтарындағы Сиверс алма ағашының жабайы екпелерін ауруға шалдығуға жүргізілген мониторингтік зерттеулердің нәтижелері берілген. Зерттеулер барысында зерттелген аймақтарда қотыр (*Fusicladium dendriticum*), монилиоз шірігі (*Monilia fructigena*), цитоспороз (*Cytospora capitata*), алма ұнтақты көгеру (*Podosphaera leucotricha*), тат (*Podosphaera leucotricha*) сияқты аурулардың бар екендігі анықталды. (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.) және әртүрлі этиологияның дақтары. Құрғақ 2021 жылы жабайы жеміс екпелерінде қотырдың, монилиоздық жеміс шіріктерінің, түрлі дақтардың және тот басудың көрінісі әлсіз болды. Ағымдағы жылдың негізгі ауруы құрғақшылықтан азап шеккен ағаштарда паразиттенген ұнтақты көгеру болды.

**Кілтті сөздер:** мониторинг, аурулар, Sievers жабайы алма ағашы, фитопатогендер, патоген.

IRSTI: 62.09.39

E.T. ISMAILOVA<sup>1</sup>, A.K. SADANOV<sup>1</sup>, O.N. SHEMSHURA<sup>1</sup>, A.I. BAIDALINOV<sup>1</sup>,  
D.A. TLEUBEKOVA<sup>1</sup>, G.B. BAIMAKHANOVA<sup>1</sup>, G.A. ZHARMUKHAMEDOVA<sup>2</sup>,  
ZH.K. ZHUMANOVA<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>LLP «Kazakh Research Institute of Horticulture», Almaty, Kazakhstan

## PHYTOSANITARY MONITORING OF SIEVERS APPLE WILD-FRUIT PLANTS FOR DISEASE AFFECT IN THE CONDITIONS OF SOUTHERN, SOUTH-EASTERN AND CENTRAL KAZAKHSTAN

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.04

### Abstract

The article presents the results of monitoring surveys in the Southern, South-Eastern and Central regions of Kazakhstan of wild plantings of the Sievers apple tree for disease infestation. During the research, it was found that in the surveyed regions there were such diseases as scab (*Fusicladium dendriticum*), moniliose fruit rot (*Monilia fructigena*), cytosporosis (*Cytospora capitata*), apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*), rust (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.) and spotting of various etiologies. In the drought period of 2021, the

manifestation of scab, moniliose fruit rot, various types of spotting and rust on wild fruit plantations was weak. The main disease in 2021 was powdery mildew, which parasitized drought-stricken trees.

**Key words:** monitoring, diseases, Sievers wild apple tree, phytopathogens, pathogen

Kazakhstani wild apple tree *Malus sieversii* (Ledeb) M. Roem., which is a native of Kazakhstani fruit forests, is recognized as the ancestor of the apple tree *Malus domestica*. In our days, the genetic resources of apple forests are recognized as the world source of resistance genes for the selection of fruit crops. The gene pool of the Kazakhstani Sievers apple tree can serve as the basis for the creation of winter-hardy, drought-resistant, disease-resistant varieties. On the territory of Kazakhstan, groves of the Sievers apple tree are concentrated mainly in the Zailiysky and Dzungarian Alatau at an altitude of 2500-3000 m above sea level [1].

Today, the state of this unique genetic reserve is assessed as unsatisfactory due to the impact of the anthropogenic factor. The negative impacts on natural ecosystems that determine the degradation of fruit forests are the mechanical destruction of fruit forests and their habitats as a result of human activities. The Sievers apple tree is listed in the Red Book of the Republic of Kazakhstan as a species with a greatly reduced range [2].

According to the Concept for the conservation and sustainable application of biodiversity in the Republic of Kazakhstan until 2030, the main goal was to preserve the wild apple tree in situ, develop a set of measures aimed at the reproduction and increase in the productivity of apple trees. However, the disadvantage of this project was that it did not pay enough attention to the biodiversity of the world of harmful insects and pathogenic microorganisms, which in some years put apple trees on the verge of survival and even death [3]. Diseases of tree crops and shrubs cause massive drying and weakening of forests, in addition, it leads to the death of individual trees and entire areas of forest plantations. As is known from previous studies [1,4-6], the wild apple tree is affected by various diseases. Therefore, it was of great concern to us at the moment what is the phytosanitary state of plantings of wild fruit plantations of the Sievers apple tree. To identify dominant types of diseases and further develop preventive measures to combat the use of environmentally sustainable biological products.

The aim of our research was to conduct a phytopathological examination of wild fruit forests and to determine the types of diseases of the wild Sievers apple tree and to study the phytopathological state of its plantings in Kazakhstan.

### **Objects and methods of research**

The object of the research was cultures of microorganisms isolated from samples of various organs (fruits, leaves, branches) of Sievers wild apple plantations, which were selected during route surveys in the South, South-East and Central regions of Kazakhstan. The examination was carried out in 2021 together with the employees of the Kazakh Research Institute of Horticulture (KazRIH) during the period of growth and fruiting of the apple tree. The selection of samples of the affected organs of the apple tree was carried out in compliance with the rules for the selection and transportation of biological material, excluding external contamination and ensuring the safety of the original microflora [8].

To assess the qualitative and quantitative composition of microbiocenoses of the apple phyllosphere, in this case were used the flush method and the method of enrichment cultures [9–11]. There are selective nutrient media: RPA, SPA and MRS for bacteria, CHA for fungi, Sabouraud for yeast, and Czapeka-Dox for actinomycetes were used for the isolation of microorganisms.

Bacterial Gram staining was performed according to the method described by Claus [10]. Cell morphology was examined by light microscopy of fixed preparations [11].

Identification of microorganisms was carried out on the basis of the study of morphological and cultural properties using the appropriate determinants [12-14].

## Results and discussion

In order to identify the main diseases of the Sievers wild apple tree, in 2021 we conducted phytosanitary research of their plantings in various regions of Kazakhstan. During the research, we identified the prevalence and harmfulness of the dominant types of diseases of the Sievers apple tree (Table 1, figure 1-3). It has been established that in the examined regions, the dominant types of diseases that pose a danger to the Sievers apple tree are the following types of diseases: scab (*Fusicladium dendriticum*), moniliose fruit rot (*Monilia fructigena*), cytosporosis (*Cytospora capitata*), powdery mildew of the apple tree (*Podosphaera leucotricha*), rust (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.), spotting (*Bacterium cerasi*) of various etiologies.

Scab, caused by a fungus (*Venturia inaequalis*), is the main disease affecting wild apple orchards. This disease reduces the yield of fruit trees and impairs fruit quality. It was found that in 2021, the climatic conditions for Kazakhstan were very dry, and therefore the manifestation of diseases was weak in all regions of the study, and in some apple plantations it was completely absent. The causative agent of this disease was isolated from affected leaves and fruits during the growing season of trees.

Powdery mildew, the causative agent of the disease, the fungus *Podosphaera leucotricha*, ranks second in terms of severity. Due to the fact that the causative agent of this disease is an obligate parasite, the manifestation of the disease in this acutely dry year on oppressed plants was significant. The maximum manifestation of the disease on individual trees in the Turkestan and Zhambyl regions reached 25%. The causative agent of powdery mildew was isolated from young shoots and leaves of an apple tree.

During the fruiting period, we found apple fruits affected by monilous fruit rot (*Monilia fructigena* Pers.). This disease was found to a weak degree in the Zhongar-Alatau Reserve (Chernovskoye AI, Kokzharskoye AI) in the Ile-Alatau Reserve (Soldatskoe Gorge, Aksai Gorge). Cytosporosis (*Cytospora capitata* S.) occurred in all regions of the survey on individual trees in varying degrees of manifestation from 5% to 35%.

The causative agent of cytosporosis was isolated from the affected branches and trunks of apple trees. Signs of damage by rust (*Gymnosporangium juniperinum* Mart.) and other types of spotting were weakly manifested on single trees and did not pose a particular danger to trees (Table 2). Such a disease as bacterial blight (*Erwinia amylovora*), which is especially harmful on cultivated apple plantations, was not found by us on wild fruit plantations.

Table 1 - The results of a phytosanitary survey of wild plantations of the Sievers apple tree for disease infestation, 2021.

Sampling location		The main diseases of the wild apple tree						
		Moniliose fruit rot 3	Scab 4	Cytosporosis 5	Powdery mildew 6	Pitting 7		
1	2							
Zhongar-Alatau Reserve State National Natural Park	The tract Pikhtovoye Cordon «Aspen»	-	+	++	+	-	-	
	Cordon «Black River»	-	+	+	+	-	-	
	Chernivtisi inspection site	+	-	+	+	-	-	
	Kokzhar inspection site	+	+	-	+	+	+	
	Topolevsky inspection site	-	+	+	+	-	-	
	Vicinity of Tekeli city	-	-	-	-	-	-	
	Surroundings of the village of Kabanbay	-	-	+	+	-	-	
	Soldier Gorge	-	+	-	-	-	-	
	Kuznetsova Shchel (genetic reserve) Turgen.	+	+	++	+	-	-	
	Taldy-Bulak Malovodnenskoye forestry	+	++	+	+	-	-	
Small Kyrgyzsai	+	-	+	+	+	+		
Aksai Gorge	-	++	-	+	-	-		
Gorge Kotur-Bulak territory of the Talgar branch of the national park	-	+	+	+	-	-		
Stone gangways	-	+	+	+	-	-		

Continuation of table 1

1	2	3	4	5	6	7
Zhambyl region	Karatau State National Natural Park	+	-	-	++	-
Turkistan region	Tulkubas district «Aksu Zhabagly» State National Natural Park,	-	-	+	++	-
	Aksu Zhabagly (private farmstead)	+	+	-	-	-
Tarbagatai State National Natural Park	Sairam-Ugam State National Natural Park	-	+	+	++	-
	Sairam district, Mankent Floodplain of the Urzhar River	-	+	-	+	+

## Note:

- +++ - severe disease manifestation (from 30% and more)
- ++ - average disease manifestation (from 5% to 20%)
- + - mild disease manifestation (from 1% to 5%)
- - disease absence (0 %)



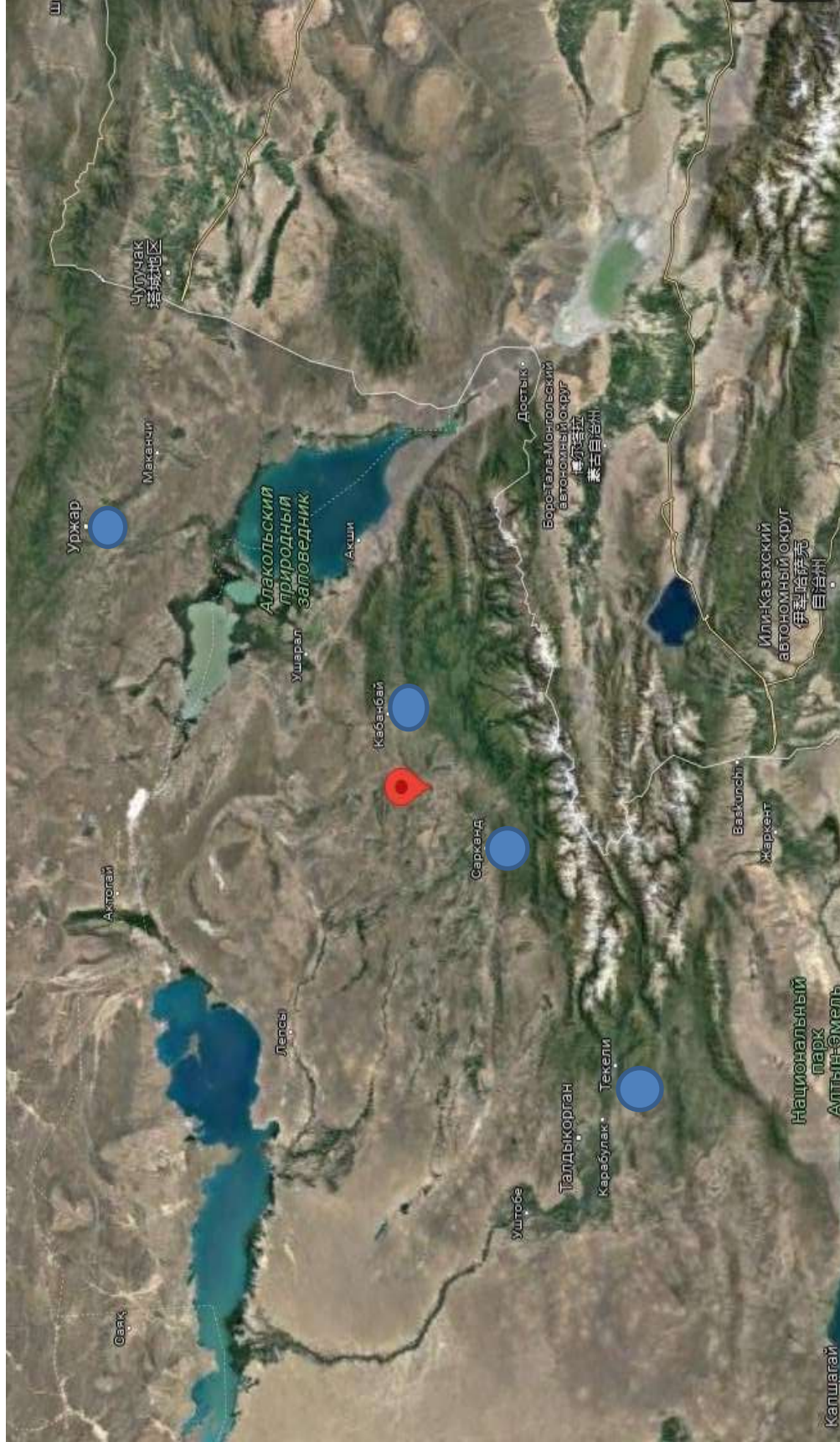


Figure 1 - Testing locations of the Sievers apple tree in Zhongar - Alatau Reserve and the State National Natural Park «Tarbagatai»



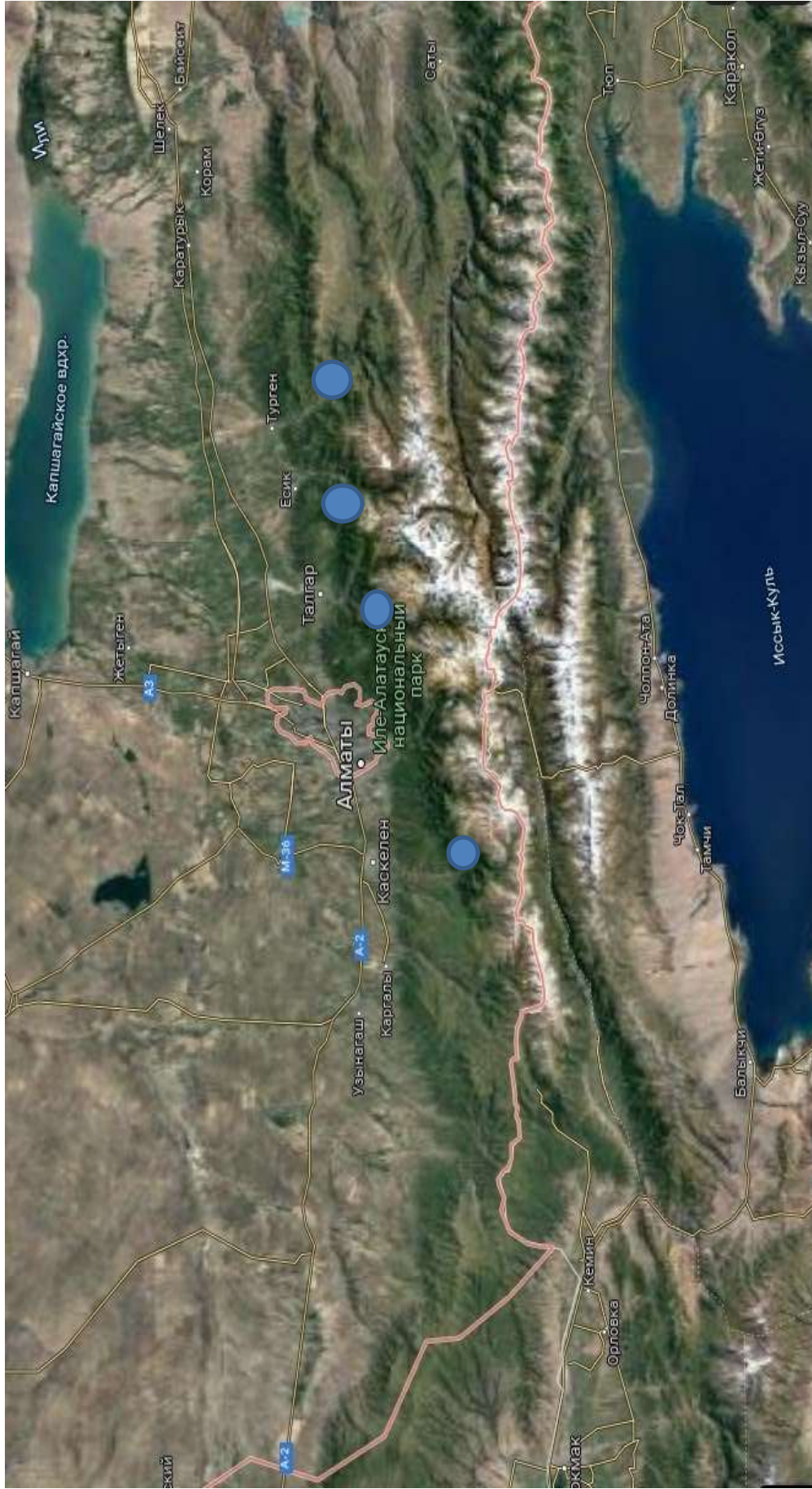


Figure 2 – Testing locations of disease infestation of the Sievers apple tree in the Ile-Alatau nature reserve



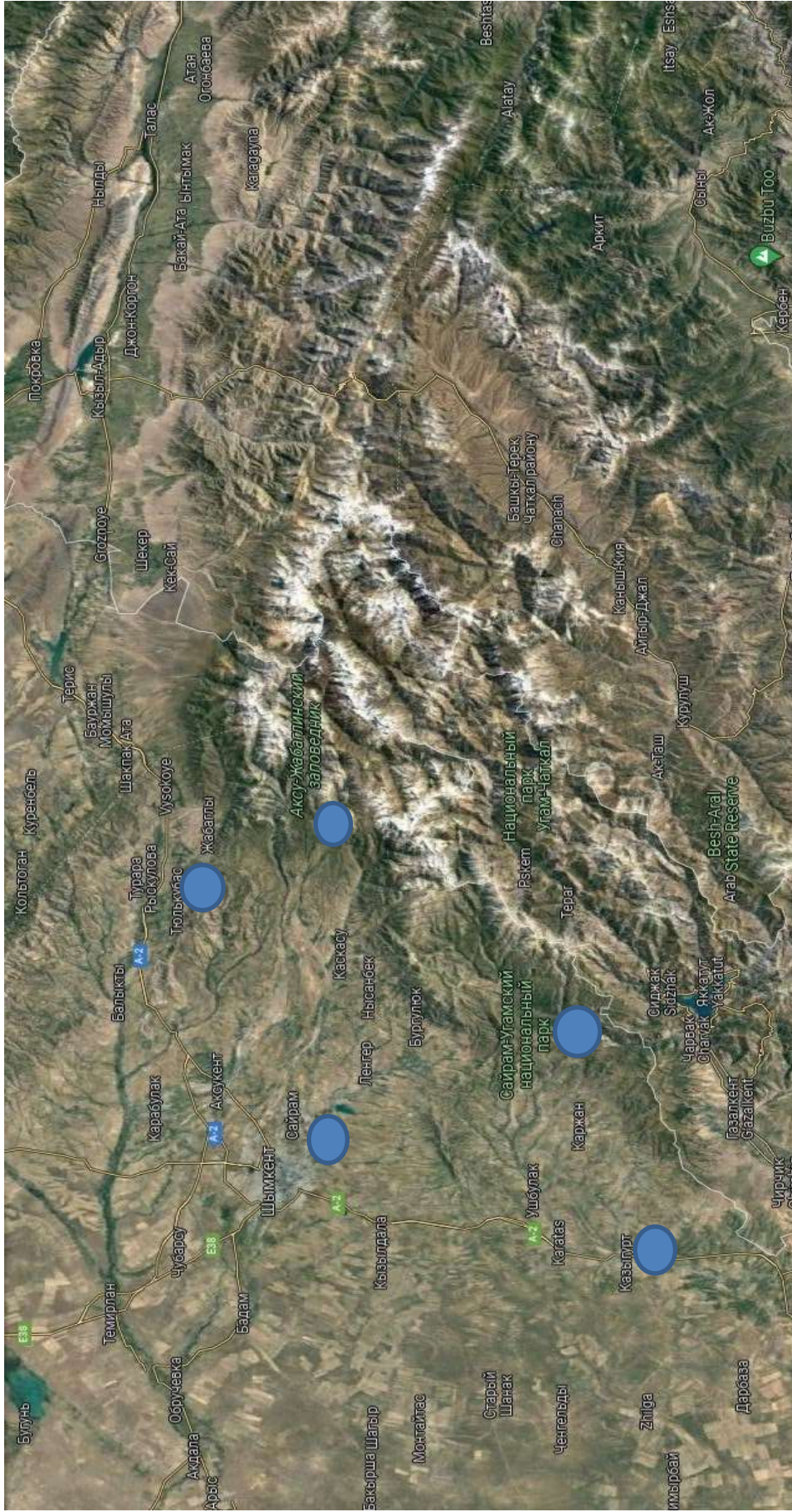






Figure 3 – Testing locations of disease infestation of the Sievers apple tree in Sairam-Ugam and Aksu-Zhabagly national parks





Continuation of table 2

1	2	3	4	5
<p>Powdery mildew</p>	<p><i>Podosphaera leucotricha</i></p>	<p>Young shoots, Leaves</p>		
<p>Moniliose rot</p>	<p><i>Monilia fructigena</i></p>	<p>Fruit</p>		

Continuation of table 2

1	2	3	4	5
Cytosporosis	<i>Cytospora capitata</i>	Sticks		
Pitting	<i>Gymnosporangium juniperinum</i>	Leaves		

To summarize, during the research it was found that in the established locations there were diseases such as scab (*Fusicladium dendriticum*), moniliose fruit rot (*Monilia fructigena*), cytosporosis (*Cytospora capitata*), apple powdery rose (*Podosphaera leucotricha*), rust (*Gymnosporangium juniperinum*). Mar.) and spotting of various etiologies. In the drought year of 2021, large scab, moniliose fruit rot, various types of spotting and rust were detected on wild fruit plantations. The principal disease in 2021 was powdery rose, which parasitized drought-stricken trees.

### References:

- 1 Dzhangaliev A. D. Unikal'noe i global'noe znachenie genofonda yablonevy`kh lesov Kazakhstana. Doklady` Nacziional'noj akademii nauk Respubliki Kazakhstan, 2007, № 5, s.41–47.
- 2 Krasnaya kniga. – Izd. 2-e, pererabotannoe i dopolnennoe. Tom 2.: Rasteniya. – Astana.: TOOPrintXXI, 2014. – S.144-145.
- 3 Konczepczia po sokhraneniyu i ustojchivomu ispol'zovaniyu biologicheskogo raznoobraziya Respubliki Kazakhstan do 2030 goda, Astana, 2015.
- 4 Rakhimova E., Byzova Z., Valieva B., Dernovskaya L. Diversity of microfungi in fruit firests of Ili-Alatau National park (Kazakhstan) // Phytopathol. Pol. – Poznan, 2005. – Vol. 35. – P. 203–212.
- 5 Nam G.A., Rakhimova E.V., Ky`zmetova L.A. Osnovny`e patogenny`e griby` v plodovy`kh lesakh Zailijskogo Alatau // Problemy sokhraneniya gornogo rastitel'nogo agrobioraznoobraziya v Kazakhstane: Sb tezisov Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. – Almaty, 2007. – S. 70–74.
- 6 Rakhimova E.V., Nam G.A. Mikobiota yabloni Siversa v Kazakhstane // Dikoplodovy`e lesa Kazakhstana: voprosy` sokhraneniya i racziional'nogo ispol'zovaniya genofonda global'nogo znacheniya: Sb. tezisov Mezhdunar. nauchn.-prakt. konf. – Almaty, 2012. – S. 76–80.
- 7 Ajnabekov M.S., Turekhanova R.M., Ivashhenko A.A. O sokhraninii dikoj yabloni i abrikosa na territorii Ile-Alatauskogo GNPP // Materialy Mezhdunarodnoj konferenczii «Problemy izucheniya, sokhraneniya i 27 Yablonya Siversa v Ile-Alatauskom NP: rezul'taty i perspektivy monitoringa racziional'nogo ispol'zovaniya vodny`kh i okolovodny`kh e`kosistem», posvyashhennoj 80-letiyu so dnya rozhdeniya d.b.n. prof. V.P.Mitrofanova. Vestnik Kaz NU. Seriya e`kologicheskaya. - 2012. №1. – S.238-241.
- 8 Metodicheskie ukazaniya po monitoringu chislennosti vreditel'ej, sorny`kh rastenij i razvitiya boleznej sel'skokhozyajstvenny`kh kul'tur. – Astana, 2004.- 267 s.
- 9 Chumaevskaya M.A., Matveeva E.V. Metodicheskie ukazaniya po izolyaczii i identifikaczii fitopatogenny`kh bakterij. – M.: Kolos, 1986. – 40 s.
- 10 Claus D.C. A standardized Gram staining procedure // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1992. – Vol. 8. – P. 451-452.
- 11 Klement Z., Rudolph K., Sands D.C. Methods in phytobacteriology. – Budapest: Akademiai Kiado, 1990.
- 12 Netrusov A. I. i dr Praktikum po mikrobiologii: Ucheb. posobie dlya stud. vy`ssh. ucheb. zavedenij – M.: Izdatel'skij cenztr «Akademiya», 2005. – 604 s.
- 13 Satton D., Fotergill A., Rinal'di M. Opredelitel` patogenny`kh i uslovno patogenny`kh gribov. – M.: Mir, 2001. – 468 s.
- 14 Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2: The Proteobacteria (Part C). – 2nd Ed. – Springer US, 2005. – 1388 p.

МРНТИ 62.09.39, 69.25.15, 34.27.39, 34.27.51

А.В. ЧИЖАЕВА<sup>1</sup>, А.А. АМАНГЕЛДІ<sup>1</sup>, А.Ж. АЛЫБАЕВА<sup>1</sup>, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА<sup>1</sup>,  
И.Ю. ПОТОРОКО<sup>2</sup><sup>1</sup>ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», г. Алматы,  
Казахстан<sup>2</sup>ФГАОУ ВО "Южно-Уральский государственный университет», г. Челябинск

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ И ЭКЗОПОЛИСАХАРИД-ПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АКВАКУЛЬТУРЕ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.05

### Аннотация

Исследована протеолитическая активность и способность к продуцированию экзополисахаридов у 17 штаммов молочнокислых бактерий и 8 штаммов пропионовокислых бактерий. Наиболее высокой протеолитической активностью среди исследуемых молочнокислых бактерий обладают вновь выделенные изоляты *Wf-20*, *Wf-2*, *Wf-10* и коллекционный штамм *Lacticaseibacillus casei Ai-2*. Среди пропионовокислых бактерий наиболее высокой протеиназно-пептидазной активностью обладают новые изоляты *П-2*, *П-3*, *П-4*, *П-8* и коллекционный штамм *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii-3*. Наибольшее количество экзополисахаридов синтезируют новые изоляты *Mg-1* (320 мг/100 мл) и *Mg-2* (360 мг/100 мл). Еще 4 новых изолята молочнокислых бактерий (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) и 4 новых изолята пропионовокислых бактерий (*П-2*, *П-4*, *П-5*, *П-8*) можно отнести к штаммам со средней степенью продукции экзополисахаридов – от 110 до 220 мг/100 мл среды. В результате проведенных исследований отобраны 7 штаммов - кандидатов в пробиотики для аквакультуры: изоляты молочнокислых бактерий *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* и изоляты пропионовокислых бактерий *П-2*, *П-3* и *П-8*, обладающие средней или высокой протеолитической и экзополисахарид-продуцирующей способностью. Введение их в состав пробиотических препаратов для рыб позволит улучшить процессы пищеварения, ускорить адаптацию животных к высокоэнергетическим рационам и небелковым азотистым веществам, повысить эффективность использования корма, резистентность к болезням, выживаемость и продуктивность рыб.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии, протеолитическая активность, продуцирование экзополисахаридов, пробиотик, аквакультура.

Аквакультура является динамично развивающимся направлением продовольственного сектора, способным решить проблемы здорового и белкового питания. Согласно последней мировой статистике ФАО, мировое производство аквакультуры достигло в 2018 г рекордного уровня - 114,5 млн тонн в живом весе, стоимость продаж составила 263,6 млрд долларов США. В общем объеме продукция водных животных составляла 82,1 млн. тонн (250,1 млрд долларов США), среди них преобладали рыбы (54,3 млн. тонн, 139,7 млрд долларов США), произведенные в аквакультуре внутренних водоемов (47 млн т, 104,3 млрд долларов США), а также в морской и прибрежной аквакультуре (7,3 млн т, 35,4 млрд долларов США). Помимо рыбы в аквакультуре водных животных были произведены моллюски (17,7 млн тонн, 34,6 млрд долларов США), ракообразные (9,4 млн. тонн, 69,3 млрд долларов США), морские беспозвоночные (435 400 тонн, 2 млрд долларов США), водные черепахи (370000 тонн, 3,5 млрд долларов США) и лягушки (131300 тонн, 997 млн долларов США) [1].

На глобальном уровне, начиная с 2016 года, аквакультура является основным источником рыбы, доступной для употребления в пищу, в 2018 г эта доля составляла 52

процента от общего объема, опередив рыболовство. И по прогнозам ФАО, в ближайшие годы следует ожидать еще большего роста производства аквакультуры в мире, причем его большая доля будет приходиться на страны Азии [1].

Однако, быстрое расширение интенсивной аквакультуры уже привело к увеличению распространенности трансграничных вирусных, бактериальных, паразитарных и грибковых инфекций у культивируемых водных организмов, что повлияло на устойчивость производства аквакультуры во многих странах [2]. Весьма существенные экологические, социальные и экономические последствия вспышек заболеваний обуславливают необходимость смены парадигмы в работе с рисками биобезопасности аквакультуры. Новая стратегия улучшения контроля безопасности предусматривает инновационные технические разработки, касающиеся усиления профилактики заболеваний в аквакультуре (включая снижение устойчивости к противомикробным препаратам в аквакультуре и применении подходящих альтернатив противомикробным препаратам), кормов, генетического отбора, биозащиты и контроля болезней, цифровых инноваций и т.д. [1].

Альтернативным эффективным профилактическим и защитным средством для уменьшения зависимости от антибиотиков, вакцин и других лекарственных химиопрепаратов, а также для улучшения здоровья рыб в аквакультуре могут служить препараты на основе живых клеток микроорганизмов и/или их метаболитов (пробиотики, метабиотики и т.д.) [3-7]. При этом, молочнокислые и пропионовокислые бактерии можно рассматривать при разработке таких препаратов как наиболее успешные и безопасные микроорганизмы для аквакультуры. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии являются представителями микробиоты рыб и человека, они обладают антагонистической активностью к условно-патогенным бактериям, грибам и вирусам, возбуждающим микробиологическую порчу кормов, загрязняющим водоемы, а также вызывающим заболевания рыб. Многочисленные научные исследования доказывают ценность этой обширной группы микроорганизмов для предотвращения и лечения заболеваний рыб и других водных организмов [3,8]. Живые клетки молочнокислых и пропионовокислых бактерий, их ферменты и метаболиты положительно влияют на резистентность к инфекционным заболеваниям, выживаемость и продуктивность рыб. Пропионовокислые бактерии, обладающие повышенной фунгицидной активностью, при введении их в состав ассоциаций в дополнение к молочнокислым бактериям позволяют расширить спектр антагонистической активности пробиотика в отношении микотоксигенных грибов. Антимутагенная защита пропионовокислых бактерий может способствовать снижению генетических изменений у рыб [9].

Одним из важных критериев, которым должен обладать успешный кандидат в пробиотики, помимо антагонистической активности, безопасности и др., является способность штаммов микроорганизмов производить органические кислоты, внеклеточные ферменты (протеаза, производство амилазы, целлюлозы, фитазы, хитиназы, липазы и др.) и экзополисахариды (ЭПС) [5]. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии синтезируют молочную, пропионовую и уксусную кислоты, которые обладают антимикробными свойствами, способствуют улучшению пищеварения, нормализации микробиоты водных животных, а также поддержанию чистоты воды в искусственных водоемах [10,11]. Производство и доступность внеклеточных ферментов, таких как протеазы, карбогидразы, амилазы, липазы и фитазы у молочнокислых и пропионовокислых бактерий способствуют тому, что пробиотики на их основе положительно влияют на темпы роста хозяина, улучшая конверсию и усвояемость корма. Помимо этого, продуцируемые этой группой микроорганизмов экзополисахариды, обладают защитными свойствами, способностью сорбировать микотоксины и вещества, вызывающие токсические, аллергические реакции и гиперчувствительность к компонентам корма. Молочнокислые и пропионовокислые бактерии участвуют в формировании феномена «оральной толерантности» к пищевым антигенам.



В связи с вышеизложенным, проводимые исследования, направленные на поиск новых отечественных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий с высокой ферментативной и экзополисахарид-продуцирующей активностью для последующей разработки на их основе высокоактивного стабильного пробиотического препарата для кормления рыб в условиях аквакультуры, являются актуальными, имеют научную и практическую значимость.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили изоляты молочнокислых и пропионовокислых бактерий, выделенные из сырьевых компонентов (зерно и мука кукурузы, пшеницы, ячменя ржи, пшеничная клейковина и зародыш, кукурузный глютен и др.), входящих в рецептуры кормов для рыб и других естественных источников (молочные продукты, рубец КРС, кишечник рыб), а также коллекционные штаммы. Образцы сырья для выделения новых штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий отбирали из различных регионов РК (Алматинская, Туркестанская, Восточно-Казахстанская, Костанайская и Павлодарская области).

Изоляты молочнокислых бактерий получали методом высева определенного количества сырья и его разведений на агаризованные селективные питательные среды MRS (TM Media, Индия) и Lactic Streak Agar (TM Media, Индия). Для выделения пропионовокислых бактерий использовали агар ASLA с ростовой добавкой для пропионовокислых бактерий. Культивирование изолятов проводили в анаэробных условиях в атмосфере с содержанием 14-16% углекислого газа, 4-6% водорода и кислорода — не более 0,1%, при температуре 30, 37 и 42°C в течение 24-48 часов.

Отдельные колонии пересевали в стерильное обезжиренное молоко; изоляты, образующие сгусток, использовали для получения чистой культуры и дальнейших исследований их пробиотических свойств. Для культивирования чистых культур молочнокислых и пропионовокислых бактерий использовали жидкую питательную среду MRS Broth (TM Media, Индия), для пропионовокислых бактерий дополнительно использовали среду следующего состава: пептон -1,0%; дрожжевой экстракт — 1,0%; глюкоза – 1,5%; восстановители (0,5% сульфита натрия или 0,05% цистеина и 0,05 % твина-80).

Кислотообразование штаммов оценивали по активной и титруемой кислотности при культивировании в стерильном обезжиренном молоке или среде MRS Broth. Титруемую кислотность определяли титрометрическим методом, активную кислотность (pH) определяли потенциометрически при помощи электронного pH-метра [12].

Протеолитическую активность выделенных изолятов определяли на питательной среде следующего состава (% мас./об.): пептон - 0,5; говяжий экстракт - 0,3; обезжиренное молоко -1; агар -1,8; вода -100. Молоко стерилизовали отдельно, добавляли перед использованием в стерильную расплавленную среду, тщательно перемешивали. Теплую питательную среду разливали по чашкам Петри и давали остыть, далее агаровую среду перфорировали стерилизованной пробкой Бора и заливали в лунки суточную культуру молочнокислых или пропионовокислых бактерий, предварительно выращенную на MRS Broth при соответствующей оптимальной температуре (30,37°C). Чашки выдерживали при 32-37°C в течение 48 ч инкубации и наблюдали за протеазой по зоне просветления молочной среды вокруг лунки, измеряя диаметр зоны [13].

Экзополисахаридобразующую активность молочнокислых и пропионовокислых бактерий определяли следующим образом: культивирование бактерий проводили в колбах (объемом 50 мл) в жидкой среде MRS Broth (pH=6,0) при температуре 32-37°C в течение 48 ч. Далее образование ЭПС определяли согласно схеме:

- 1) отделение культуральной жидкости от биомассы,
- 2) центрифугирование при 5000 g в течение 15 мин,
- 3) охлаждение бесклеточного супернатанта до 4°C,

4) внесение в охлажденный супернатант двойного объема 96% охлажденного этилового спирта (3-5 °С); отстаивание в течение 12 ч при температуре 4 °С,

5) центрифугирование при 4000 g в течение 60 мин,

6) промывание осадка этиловым спиртом, высушивание ЭПС при 50°С до постоянного веса (в течение 48 часов), взвешивание.

### Результаты и обсуждение

С целью отбора высокоактивных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий был проведен скрининг ферментативной и экзополисахарид-продуцирующей активности у 22-х выделенных чистых изолятов бактерий, а также у трех коллекционных культур с высокой антагонистической активностью (*Lactobacillus helveticus* Sh-4, *Lacticaseibacillus casei* Ai-2, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* -3). Скрининг проводили по следующим признакам: кислотообразование, протеолитическая активность и способность к образованию экзополисахаридов.

Результаты исследования кислотообразующей и протеолитической активности у выделенных и коллекционных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий, представленные в таблице 1, свидетельствуют о наличии среди них как штаммов с высокой

Таблица 1 – Физиолого-биохимическая активность выделенных и коллекционных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий

Штамм	Активная кислотность, рН	Титруемая кислотность, °Т	Протеолитическая активность, диаметр зоны, мм
1	2	3	4
<b>Молочнокислые бактерии</b>			
<i>Mg-1</i>	4,6	96±0,38	8±0,05
<i>Mg-2</i>	4,5	98±0,33	9±0,03
<i>Wg-1</i>	3,9	164±0,10	9±0,03
<i>Wg-3</i>	4,0	152±0,62	9±0,02
<i>Wg-4</i>	3,5	200±0,28	9±0,04
<i>Wg-8</i>	3,6	191±0,68	11±0,04
<i>Wg-35</i>	3,4	210±0,48	10±0,02
<i>Wf-2</i>	3,0	254±0,16	12±0,04
<i>Wf-6</i>	3,0	249±0,37	10±0,02
<i>Wf-10</i>	4,7	89±0,01	12±0,03
<i>Wf-20</i>	3,1	241±0,16	20±0,04
<i>Wf-71</i>	3,6	190±0,18	8±0,03
<i>Rg -9</i>	4,5	103±0,02	9±0,02
<i>Rf -3</i>	4,3	120±0,21	10±0,05
<i>Kc-1</i>	3,3	220±0,12	9±0,01
<i>Lb.h. Sh-4</i>	3,3	220±0,02	9±0,01
<i>Lb.c. Ai-2</i>	3,1	240±0,04	12±0,02
<b>Пропионовокислые бактерии</b>			
<i>П-1</i>	4,4	109±0,17	9±0,01
<i>П-2</i>	4,3	125±0,12	16±0,03
<i>П-3</i>	4,4	115±0,13	14±0,02
<i>П-4</i>	3,9	160±0,14	13±0,02

## Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>П-5</i>	4,3	120±0,09	11±0,01
<i>П-7</i>	4,4	110±0,39	10±0,01
<i>П-8</i>	4,2	130±0,27	12±0,02
<i>Pb.sh.-3</i>	4,3	125±0,07	12±0,01

энергией кислотообразования и средней протеолитической активностью (*Wg-35*, *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*, *Kc-1*, *Ai-2*, *П-4*), так и штаммов с низкой способностью к продукции кислот и пептизации белка (*Mg-1*, *Mg-2*, *Rg-9*, *П-1*).

При тестировании культур молочнокислых и пропионовокислых бактерий на протеолитическую активность выявлено, что при добавлении в молочный агар небольших количеств пептона и мясного экстракта наблюдается активация ферментных протеолитических систем у всех штаммов бактерий. Среди всех исследуемых культур следует отметить новый выделенный изолят молочнокислых бактерий *Wf-20* и изолят пропионовокислых бактерий *П-2* (рисунок 1), обладающие наиболее высокой протеиназно-пептидазной активностью, сравнимой с активностью известных производственных пробиотических штаммов [12]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования наиболее активных штаммов в составе пробиотического препарата для рыб, поскольку продукция органических кислот, а также внеклеточных и клеточно-связанных протеиназ и пептидаз обуславливает лечебно-профилактические свойства культур, играет существенную роль в нормализации белкового обмена в организме, способствует лучшей конверсии и усвоению корма [14].

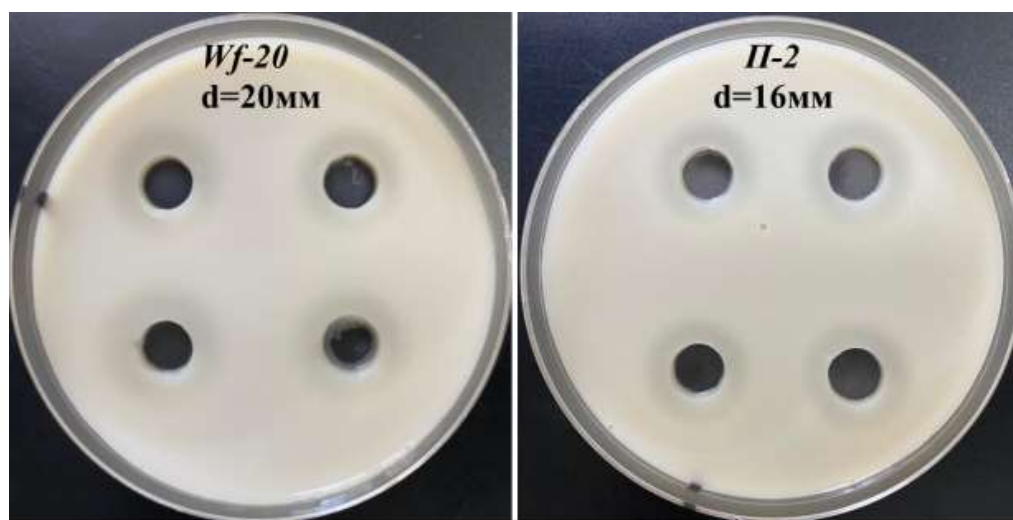


Рисунок 1 – Протеолитическая активность изолята молочнокислых бактерий *Wf-20* и изолята пропионовокислых бактерий *П-2* на молочном агаре с добавлением пептона и мясного экстракта, d - диаметр зоны протеолиза

Способность к продукции экзополисахаридов – весьма ценный признак для пробиотических микроорганизмов. Выделяемые экзополисахариды обладают протекторной функцией, защищают клетки от высушивания, повышают их устойчивость к стрессам в неблагоприятных условиях. Способность к продуцированию экзополисахаридов, обладающих термо- и криопротекторными свойствами, будет увеличивать выживаемость пробиотических микроорганизмов при получении сухой формы препарата, а также в случае ввода пробиотика в состав экструдированных кормов для рыб. Экзополисахариды также способствуют адгезии пробиотических

микроорганизмов на слизистых покровах и стенках кишечника рыб, участвуют в регуляции роста и размножения полезных микроорганизмов, в иммунных процессах и т.д.

Результаты исследования способности к образованию экзополисахаридов у выделенных и коллекционных молочнокислых и пропионовокислых бактерий, представленные на рисунках 2 и 3, свидетельствуют о том, что все тестируемые микроорганизмы в разной степени продуцируют ЭПС. Наибольшее количество полисахаридов экскретируют изоляты молочнокислых бактерий *Mg-1* (320 мг/100 мл) и *Mg-2* (360 мг/100 мл). Еще 4 новых изолята молочнокислых бактерий (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) и 4 новых изолята пропионовокислых бактерий (*П-2*, *П-4*, *П-5*, *П-8*) можно отнести к штаммам со средней степенью продукции экзополисахаридов – от 110 до 220 мг/100 мл среды.

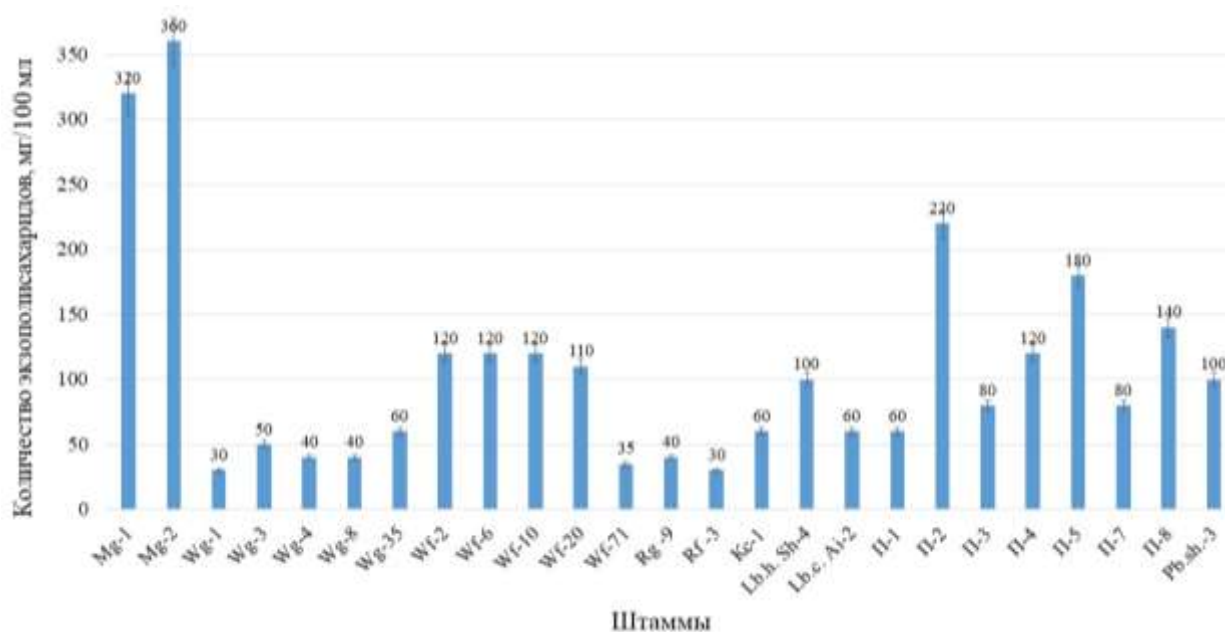


Рисунок 2 – Экзополисахарид-продуцирующая активность молочнокислых и пропионовокислых бактерий



Рисунок 3 – Образование экзополисахаридов изолятами *П-7* и *Wf-20*

Таким образом, в результате скрининга физиолого-биохимических свойств 22-х новых и 3-х коллекционных штаммов, отобраны 7 штаммов-кандидатов в пробиотики:

изоляты молочнокислых бактерий *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* и изоляты пропионовокислых бактерий *П-2*, *П-3* и *П-8*, обладающие высокой и средней протеолитической и экзополисахарид-продуцирующей активностью.

Разработка на их основе инновационного пробиотического препарата для предотвращения развития микробиологической порчи кормов для рыб, улучшения их качества, санитарного состояния и увеличения сроков хранения; улучшения санитарного состояния водоемов для рыб, а также для повышения продуктивности и резистентности ценных видов рыб к инфекционным заболеваниям будет способствовать устойчивому развитию аквакультуры и получению безопасной рыбной продукции.

#### **Финансирование**

Данное исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP09258412).

#### **Литература:**

- 1 FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. – 2020. – 224 p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- 2 Stentiford G.D., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Williams B.A., Withyachumrarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis // *PLoS Pathog.* – 2017. – №13. – e1006160.
- 3 Ringø E., Doan H.V., Lee S.O., Soltani M., Hoseinifar S.H., Harikrishnan R., Song S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture // *J. Appl. Microbiol.* – 2020. – Vol.129, Is.1. – P. 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>
- 4 Dawood M.A.O., Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review // *Aquaculture.* – 2016. – Vol. 454. – P. 243-251.
- 5 Goutam Banerjee, Arun Kumar Ray. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries // *Research in Veterinary Science.* – 2017. – Vol. 115. – P.66-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>
- 6 Narayanan Gobi, Baskaralingam Vaseeharan, Jiann-Chu Chen, Ravichandran Rekha, Sekar Vijayakumar, Mahalingam Anjugam, Arokiadhas Iswarya. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis Dabhl* improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus* // *Fish and Shellfish Immunology.* – 2018. – Vol. 74. – P. 501-508.
- 7 Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V., Lymbery A.L., Roy S., Ringø E.. Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bioactive components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish// *Rev. Fish. Sci. Aquac.* – 2019. – Vol.27, Is.3. – P.331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>
- 8 Le B., Yang S.H. Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus* // *J. Microbiol.* – 2018. – Vol.56. – P. 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>
- 9 Zarate G. Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotics to Improve the Human and Animal Health // *Probiotic in Animals.* – 2012.
- 10 Garc'es M.E., Olivera N.L., Fern'andez M., Rossi C.R., Sequeiros C. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing *Carnobacterium* spp. isolated from healthy Patagonian trout and their potential for use in aquaculture // *Aquac. Res.* – 2020. <https://doi.org/10.1111/are.14806>
- 11 Gong L., He H., Li D., Cao L., Ali Khan T., L, Y., Pan L., Yan,L., Ding X., Sun Y., Zhang Y., Yi G., Hu S., Xia L. A new isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01384>
- 12 Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 104 с.
- 13 Chirom Aarti, Ameer Khusro, Rakesh Varghese, Mariadhas Valan Arasu, Paul Agastian, Naif Abdullah Al-Dhabi, Soundharrajan Ilavenil, Ki Choon Choi. In vitro studies on probiotic and antioxidant

properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India // LWT - Food Science and Technology. – 2017. – Vol.86. – P.438-446.

14 Новик Г.И. и др. Биологическая активность микроорганизмов-пробионтов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006 – Т.42, №2. – С. 187-194.

А.В. ЧИЖАЕВА<sup>1</sup>, А.А. АМАНГЕЛДІ<sup>1</sup>, А.Ж. АЛЫБАЕВА<sup>1</sup>, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА<sup>1</sup>,  
И. Ю. ПОТОРОКО<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>"Оңтүстік-Орал мемлекеттік университеті" ФМАЖБ БМ, Челябинск қаласы

## АКВАКУЛЬТУРАДА ҚОЛДАНУ ҮШІН ПЕРСПЕКТИВАЛЫ СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ МЕН ПРОПИОН ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ ПРОТЕОЛИТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИД-ӨНДІРУШІ БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

### Түйін

Сүт қышқылды бактерияларының 17 штаммында және пропион қышқылды бактерияларының 8 штаммында протеолитикалық белсенділік пен экзополисахаридтерді өндіру қабілеті зерттелді. Зерттелген сүт қышқылы бактерияларының ішіндегі ең жоғары протеолитикалық белсенділікке жаңадан бөлінген *WF-20*, *Wf-2*, *Wf-10* изоляттары және *Lactocaseibacillus casei Ai-2* коллекциялық штаммы ие. Пропион қышқылы бактерияларының ішінде *П-2*, *П-3*, *П-4*, *П-8* жаңа оқшауланған изоляттары және *Propionibacterium freudenreichii subsp shermanii-3* коллекциялық штаммы протеиназа-пептидазаның ең жоғары белсенділігіне ие. Полисахаридтердің ең көп санын жаңа *МД-1* (320 мг/100 мл) және *Мg2* (360 мг/100 мл) изоляттары синтездейді Сүт қышқылды бактерияларының тағы 4 жаңа изоляты (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) және пропион қышқылды бактерияларының 4 жаңа изоляттарын (*П-2*, *П-4*, *П-5*, *П – 8*) экзополисахаридтер өндірісінің орташа дәрежесі бар штамдарға жатқызуға болады-110-нан 220 мг/100 мл ортада. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде аквакультура үшін пробиотиктерге үміткер 7 штамм таңдалды: сүт қышқылды бактерияларының изоляттары *WF-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* және пропион қышқылы бактерияларының изоляттары *П-2*, *П-3* және *П-8*, орташа немесе жоғары протеолитикалық және экзополисахарид-өндіру қабілеті бар. Оларды балыққа арналған пробиотикалық препараттардың құрамына енгізу ас қорыту процестерін жақсартады, жануарлардың жоғары энергиялы диеталар мен ақуыз емес азотты заттарға бейімделуін тездетеді, жемді пайдалану тиімділігін, ауруға төзімділікті, балықтардың өмір сүруін және өнімділігін арттырады.

**Кілтті сөздер:** сүт қышқылды бактериялар, пропион қышқылды бактериялар, протеолитикалық белсенділік, экзополисахаридтер өндірісі, пробиотик, аквакультура.

IRSTI: 62.09.39, 69.25.15, 34.27.39, 34.27.51

A.V. CHIZHAYEVA<sup>1</sup>, A.A. AMANGELDI<sup>1</sup>, A. Zh. ALYBAYEVA<sup>1</sup>, Ye. A. OLENIKOVA<sup>1</sup>,  
I.Y. POTOROKO<sup>2</sup><sup>1</sup>LLP «Research and Production Center of Microbiology and Virology», Almaty,  
Kazakhstan<sup>2</sup>FSAEI HE "South Ural State University", Chelyabinsk**INVESTIGATION OF THE PROTEOLYTIC AND EXOPOLYSACCHARIDE-  
PRODUCING ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA AND PROPIONIC ACID  
BACTERIA PROMISING FOR USE IN AQUACULTURE**

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.05

**Abstract**

The proteolytic activity and ability to produce exopolysaccharides in 17 strains of lactic acid bacteria and 8 strains of propionic acid bacteria were studied. The newly isolates *Wf-20*, *Wf-2*, *Wf-10* and the collection strain *Lacticaseibacillus casei Ai-2* have highest proteolytic activity among the studied lactic acid bacteria. Among propionic acid bacteria, the new isolates *P-2*, *P-3*, *P-4*, *P-8* and the collection strain *Propionibacterium freudenreichii subsp shermanii-3* have the highest proteinase-peptidase activity. The largest number of exopolysaccharides are synthesized by new isolates *Mg-1* (320mg/100ml) and *Mg-2* (360 mg/100ml). Another 4 new isolates of lactic acid bacteria (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) and 4 new isolates of propionic acid bacteria (*P-2*, *P-4*, *P-5*, *P-8*) can be attributed to strains with an average degree of exopolysaccharide production - from 110 to 220 mg/100 ml of medium. In result of the conducted studies 7 candidate strains for probiotics for aquaculture were selected: isolates of lactic acid bacteria *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* and isolates of propionic acid bacteria *P-2*, *P-3* and *P-8* having medium or high proteolytic and exopolysaccharide-producing ability. Their introduction into the composition of probiotic preparations for fish will improve the digestive processes, accelerate the adaptation of animals to high-energy diets and non-protein nitrogenous substances, increase the efficiency of feed use, disease resistance, survival and productivity of fish.

**Keywords:** lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, proteolytic activity, production of exopolysaccharides, probiotic, aquaculture.

Aquaculture is a dynamically developing area of the food sector that can solve the problems of healthy and protein nutrition. According to the latest FAO world statistics, global aquaculture production reached a record level in 2018 - 114.5 million tonnes in live weight, the value of sales amounted to USD 263.6 billion. In the total volume the farming of aquatic animals amounted to 82.1 million tonnes (USD 250.1 billion), fish predominated among them (54.3 million tonnes, USD 139.7 billion), harvested from inland aquaculture (47 million tonnes, USD 104.3 billion), as well as marine and coastal aquaculture (7.3 million tonnes, USD 35.4 billion). In addition to fish, shellfish (17.7 million tonnes, USD 34.6 billion), crustaceans (9.4 million tonnes, USD 69.3 billion), marine invertebrates (435,400 tonnes, USD 2 billion), aquatic turtles (370 000 tonnes, USD 3.5 billion) and frogs (131 300 tonnes, USD 997 million) were produced in aquaculture [1].

At the global level, since 2016, aquaculture has been the main source of fish available for food, in 2018 this share accounted for 52 percent of the total, ahead of fishing. According to FAO forecasts, even greater growth in aquaculture production in the world should be expected in the coming years, with a large share of it coming from Asian countries [1].

However, the rapid expansion of intensive aquaculture has already led to an increase in the prevalence of cross-border viral, bacterial, parasitic and fungal infections in cultivated aquatic organisms, which has affected the sustainability of aquaculture production in many countries [2]. The very significant environmental, social and economic consequences of disease outbreaks necessitate a paradigm shift in dealing with the biosafety risks of aquaculture. The new strategy

for improving safety control provides for innovative technical developments related to strengthening disease prevention in aquaculture (including reducing antimicrobial resistance in aquaculture and the use of suitable alternatives to antimicrobial drugs), feed, genetic selection, biosecurity and disease control, digital innovations, etc. [1].

Preparations based on living cells of microorganisms and/or their metabolites (probiotics, metabiotics, etc.) can serve as an alternative effective preventive and protective agent to reduce dependence on antibiotics, vaccines and other medicinal chemotherapeutics, as well as to improve the health of fish in aquaculture [3-7]. At the same time, lactic acid bacteria and propionic acid bacteria can be considered in the development of such drugs as the most successful and safe microorganisms for aquaculture. Lactic acid bacteria and propionic acid bacteria are representatives of the fish and human microbiota, they have antagonistic activity to conditionally pathogenic bacteria, fungi and viruses that excite microbiological spoilage of feed, pollute water bodies, and cause fish diseases. Numerous scientific studies prove the value of this vast group of microorganisms for the prevention and treatment of diseases of fish and other aquatic organisms [3,8]. Living cells of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, their enzymes and metabolites have a positive effect on resistance to infectious diseases, survival and productivity of fish. Propionic acid bacteria with increased fungicidal activity, when introduced into associations in addition to lactic acid bacteria, allow to expand the spectrum of antagonistic activity of the probiotic against mycotoxigenic fungi. Antimutagenic protection of propionic acid bacteria may contribute to the reduction of genetic changes in fish [9].

One of the important criteria that a successful candidate for probiotics should have, in addition to antagonistic activity, safety, etc., is the ability of microbial strains to produce organic acids, extracellular enzymes (protease, amylase production, cellulose, phytase, chitinase, lipase, etc.) and exopolysaccharides (EPS) [5]. Lactic acid and propionic acid bacteria synthesize lactic, propionic and acetic acids, which have antimicrobial properties, contribute to improving digestion, normalizing the microbiota of aquatic animals, as well as maintaining the purity of water in artificial reservoirs [10,11]. The production and availability of extracellular enzymes such as proteases, carbohydrases, amylases, lipases and phytases in lactic acid bacteria and propionic acid bacteria contribute to the fact that probiotics based on them positively affect the growth rate of the host, improving the conversion and digestibility of feed. In addition, exopolysaccharides produced by this group of microorganisms have protective properties, the ability to absorb mycotoxins and substances that cause toxic, allergic reactions and hypersensitivity to feed components. Lactic acid bacteria and propionic acid bacteria are involved in the formation of the phenomenon of "oral tolerance" to food antigens.

In connection with the above, the ongoing research aimed at finding new domestic strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria with high enzymatic and exopolysaccharide-producing activity for the subsequent development on their basis of a highly active stable probiotic drug for feeding fish in aquaculture conditions are relevant, have scientific and practical significance.

### **Materials and methods**

The objects of the study were isolates of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria isolated from raw materials (corn grain and flour, wheat, rye barley, wheat gluten and germ, corn gluten, etc.) included in the formulations of fish feeds and other natural sources (dairy products, cattle rumen, fish intestines), as well as collection strains. Samples of raw materials for isolation of new strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria were taken from various regions Republic of Kazakhstan (Almaty, Turkestan, East Kazakhstan, Kostanay and Pavlodar regions).

Isolates of lactic acid bacteria were obtained by seeding a certain amount of raw materials and its dilutions on elective nutrient media MRS Agar (TM Media, India) and Lactic Streak Agar (TM Media, India). To isolate propionic acid bacteria, ASLA agar with a growth additive for propionic acid bacteria was used. Isolates were cultured in an anaerostat in an atmosphere



containing 14-16% carbon dioxide, 4-6% hydrogen and oxygen - no more than 0.1%, at a temperature of 30, 37 and 42 ° C for 24-48 hours.

Individual colonies were placed into sterile skimmed milk; the isolates forming the clot were used to obtain pure culture and further studies of their probiotic properties. For the cultivation of pure cultures of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria the liquid nutrient medium MRS Broth (TM Media, India) was used, for propionic acid bacteria, the following medium was additionally used: peptone - 1.0%; yeast extract - 1.0%; glucose - 1.5%; reducing agents (0.5% sodium sulfite or 0.05% cysteine and 0.05% twin-80).

The acid formation of the strains was evaluated by the active and titratable acidity when cultured in sterile skimmed milk or MRS Broth medium. Titrated acidity was determined by titrometric method, active acidity (pH) was determined potentiometrically using an electronic pH meter [12].

The proteolytic activity of the isolates was determined on nutrient medium of the following composition (% wt./vol.): peptone - 0.5; beef extract - 0.3; skimmed milk - 1; agar - 1.8; water - 100. The milk was sterilized separately, added to a sterile molten medium before use, and thoroughly mixed. The warm nutrient medium was poured into cups and allowed to cool down, then the agar medium was perforated with a sterilized Boron plug and a daily culture of lactic acid bacteria or propionic acid bacteria, previously grown on MRS Broth at the appropriate optimal temperature (30.37 ° C), was poured into the wells. The cups were kept at 32-37°C for 48 hours of incubation and the protease was observed along the zone of enlightenment of the lactic medium around the well, measuring the diameter of the zone [13].

The exopolysaccharide-forming activity of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria was determined as follows: bacterial cultivation was carried out in flasks (with a volume of 50 ml) in a liquid medium MRS Broth (pH=6.0) at a temperature of 32-37 ° C for 48 hours. Further, the formation of EPS was determined according to the scheme:

- 1) separation of culture fluid from biomass,
- 2) centrifugation at 5000 g for 15 min,
- 3) cooling of the cell-free supernatant to 4°C,
- 4) introduction of 96% cooled ethyl alcohol (3-5 ° C) into the cooled supernatant of double volume; settling for 12 hours at a temperature of 4 ° C,
- 5) centrifugation at 4000 g for 60 min,
- 6) washing the sediment with ethyl alcohol, drying EPS at 50 ° C to a constant weight (within 48 hours), weighing.

### Results and discussion

In order to select highly active strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, screening of enzymatic and exopolysaccharide-producing activity of 22 isolates of bacteria and three collection cultures with high antagonistic activity (*Lactobacillus helveticus* Sh-4, *Lacticaseibacillus casei* Ai-2, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* -3) was carried out. Screening was carried out according to the following criteria: acid formation, proteolytic activity and the ability to form exopolysaccharides.

The results of the study of acid-forming and proteolytic activity in isolated and collection strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, presented in Table 1, indicate the presence among them as the strains with high acid formation energy and average proteolytic activity (*Wg-35*, *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*, *Ks-1*, *Ai-2*, *P-4*), and strains with low ability to produce acids and protein peptization (*Mg-1*, *Mg-2*, *Rg-9*, *P-1*).

Table 1 - Physiological and biochemical activity of isolated and collectible strains of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria

Strain	Active acidity, pH	Titrated acidity, °T	Proteolytic activity, zone diameter, mm
Lactic acid bacteria			
<i>Mg-1</i>	4,6	96±0,38	8±0,05
<i>Mg-2</i>	4,5	98±0,33	9±0,03
<i>Wg-1</i>	3,9	164±0,10	9±0,03
<i>Wg-3</i>	4,0	152±0,62	9±0,02
<i>Wg-4</i>	3,5	200±0,28	9±0,04
<i>Wg-8</i>	3,6	191±0,68	11±0,04
<i>Wg-35</i>	3,4	210±0,48	10±0,02
<i>Wf-2</i>	3,0	254±0,16	12±0,04
<i>Wf-6</i>	3,0	249±0,37	10±0,02
<i>Wf-10</i>	4,7	89±0,01	12±0,03
<i>Wf-20</i>	3,1	241±0,16	20±0,04
<i>Wf-71</i>	3,6	190±0,18	8±0,03
<i>Rg-9</i>	4,5	103±0,02	9±0,02
<i>Rf-3</i>	4,3	120±0,21	10±0,05
<i>Kc-1</i>	3,3	220±0,12	9±0,01
<i>Lb.h. Sh-4</i>	3,3	220±0,02	9±0,01
<i>Lb.c. Ai-2</i>	3,1	240±0,04	12±0,02
Propionic acid bacteria			
<i>P-1</i>	4,4	109±0,17	9±0,01
<i>P-2</i>	4,3	125±0,12	16±0,03
<i>P-3</i>	4,4	115±0,13	14±0,02
<i>P-4</i>	3,9	160±0,14	13±0,02
<i>P-5</i>	4,3	120±0,09	11±0,01
<i>P-7</i>	4,4	110±0,39	10±0,01
<i>P-8</i>	4,2	130±0,27	12±0,02
<i>Pb.sh.-3</i>	4,3	125±0,07	12±0,01

At testing cultures of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria for proteolytic activity, it was found that when small amounts of peptone and meat extract are added to milk agar, activation of enzyme proteolytic systems is observed in all bacterial strains. Among all the studied cultures, it should be noted a new isolate of lactic acid bacteria *Wf-20* and an isolate of propionic acid bacteria *P-2* (Figure 1), which have the highest proteinase-peptidase activity, comparable to the activity of known industrial probiotic strains [12]. The data obtained indicate the prospects of using the most active strains as part of probiotic preparation for fish, since the production of organic acids, as well as extracellular and cell-related proteinases and peptidases, determines the therapeutic and prophylactic properties of cultures, plays a significant role in the normalization of protein metabolism in the body, contributes to a better conversion and assimilation of feed [14].

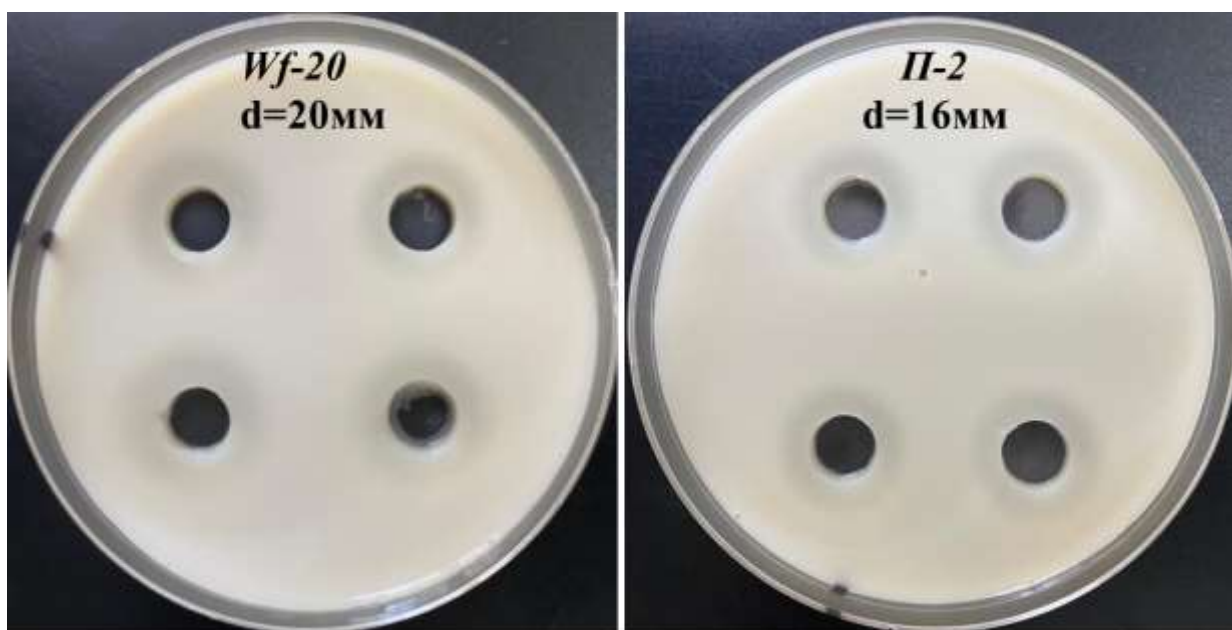


Figure 1 - Proteolytic activity of lactic acid bacteria isolate *Wf-20* and propionic acid bacteria isolate *P-2* on milk agar with the addition of peptone and meat extract, d - is the diameter of the proteolysis zone

The ability to produce exopolysaccharides is a very valuable trait for probiotic microorganisms. The secreted exopolysaccharides have a protective function, protect cells from drying out, increase their resistance to stress in adverse conditions. The ability to produce exopolysaccharides with thermo- and cryoprotective properties will increase the survival of probiotic microorganisms when obtaining a dry form of the drug, as well as in the case of introducing a probiotic into the composition of extruded fish feed. Exopolysaccharides also promote adhesion of probiotic microorganisms on the mucous membranes and intestinal walls of fish, participate in the regulation of growth and reproduction of beneficial microorganisms, in immune processes, etc.

The results study of the ability to form exopolysaccharides in isolated and collectible lactic acid bacteria and propionic acid bacteria, shown in Figures 2 and 3, indicate that all tested microorganisms produce EPS to varying degree. The greatest amount of polysaccharides is excreted by isolates of lactic acid bacteria *Mg-1* (320 mg/100 ml) and *Mg-2* (360 mg/100 ml). Another 4 new isolates of lactic acid bacteria (*Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20*) and 4 new isolates of propionic acid bacteria (*P-2*, *P-4*, *P-5*, *P-8*) can be attributed to strains with an average degree of production of exopolysaccharides - from 110 to 220 mg/100 ml of medium.

Thus, as a result of screening the physiological and biochemical properties of 22 new and 3 collection strains, 7 candidate strains for probiotics were selected: isolates of lactic acid bacteria *Wf-2*, *Wf-6*, *Wf-10*, *Wf-20* and isolates of propionic acid bacteria *P-2*, *P-3* and *P-8*, which have high and medium proteolytic and exopolysaccharide-producing activity.

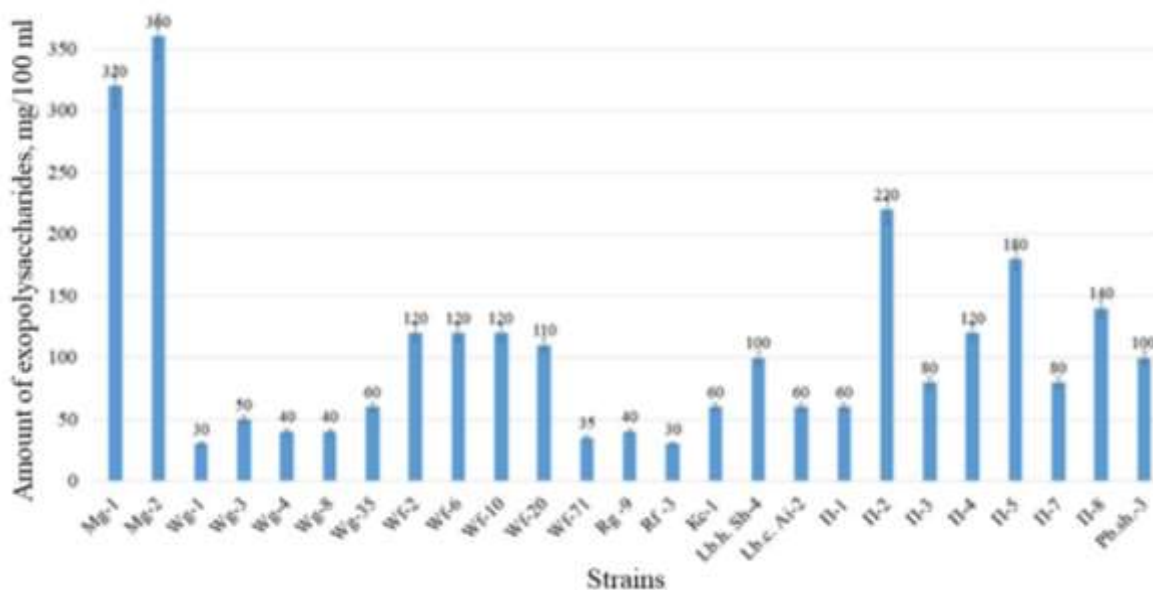


Figure 2 - Exopolysaccharide-producing activity of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria



Figure 3 - Formation of exopolysaccharides by *P-7* and *Wf-20* isolates

Development on their basis of an innovative probiotic preparation to prevent the microbiological spoilage of feed for fish, improve their quality, sanitary condition and increase shelf life; improving the sanitary condition of fish reservoirs, as well as increasing the productivity and resistance of fish to infectious diseases will contribute to the sustainable development of aquaculture and the production of safe fish products.

**Financing**

This study is funded by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant № AP09258412).

**References:**

1 FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.

– 2020. – 224 p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

2 Stentiford G.D., Sritunyalucksana K., Flegel T.W., Williams B.A., Withyachumnarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis // *PLoS Pathog.* – 2017. – №13. – e1006160.

3 Ringø E., Doan H.V., Lee S.O., Soltani M., Hoseinifar S.H., Harikrishnan R., Song S. K. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture // *J. Appl. Microbiol.* – 2020. – Vol.129, Is.1. – P. 116-136. <https://doi.org/10.1111/jam.14628>

4 Dawood M.A.O., Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review // *Aquaculture.* – 2016. – Vol. 454. – P. 243-251.

5 Goutam Banerjee, Arun Kumar Ray. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries // *Research in Veterinary Science.* – 2017. – Vol. 115. – P.66-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>

6 Narayanan Gobi, Baskaralingam Vaseeharan, Jiann-Chu Chen, Ravichandran Rekha, Sekar Vijayakumar, Mahalingam Anjugam, Arokiadhas Iswarya. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis Dahb1* improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus* // *Fish and Shellfish Immunology.* – 2018. – Vol. 74. – P. 501-508.

7 Soltani M., Ghosh K., Hoseinifar S.H., Kumar V., Lymbery A.L., Roy S., Ringø E.. Genus bacillus, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bioactive components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish// *Rev. Fish. Sci. Aquac.* – 2019. – Vol.27, Is.3. – P.331-379. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1597010>

8 Le B., Yang S.H. Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus* // *J. Microbiol.* – 2018. – Vol.56. – P. 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>

9 Zarate G. Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotics to Improve the Human and Animal Health // *Probiotic in Animals.* – 2012.

10 Garc'es M.E., Olivera N.L., Fern'andez M., Rossi C.R., Sequeiros C. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing *Carnobacterium* spp. isolated from healthy Patagonian trout and their potential for use in aquaculture // *Aquac. Res.* – 2020. <https://doi.org/10.1111/are.14806>

11 Gong L., He H., Li D., Cao L., Ali Khan T., L, Y., Pan L., Yan,L., Ding X., Sun Y., Zhang Y., Yi G., Hu S., Xia L. A new isolate of *Pediococcus pentosaceus* (SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 1384. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01384>

12 Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-epidemiologicheskoy ocenke bezopasnosti i funkcional'nogo potenciala probioticheskikh mikroorganizmov, ispol'zuemyh dlya proizvodstva pishchevyh produktov: Metodicheskie ukazaniya. M.: Federal'nyj centr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2011.104 s.

13 Chirom Aarti, Ameer Khusro, Rakesh Varghese, Mariadhas Valan Arasu, Paul Agastian, Naif Abdullah Al-Dhabi, Soundharrajan Ilavenil, Ki Choon Choi. In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. *LWT - Food Science and Technology.* 2017. Vol.86. P.438-446.

14 Novik G.I. i dr. Biologicheskaya aktivnost' mikroorganizmov-probiontov. *Prikl. biohim. i mikrobiol.* 2006. T.42, No 2. S. 187-194.

МРНТИ: 34.27.51, 68.03.07, 34.35.25, 34.29.35

Е.А. ОЛЕЙНИКОВА<sup>1</sup>, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ\*<sup>1</sup>, А.В. КЕРДЯШКИН<sup>2</sup>,  
А.Ж. АЛЫБАЕВА<sup>1</sup>, А.А. АМАНГЕЛДИ<sup>1</sup>, А.В. ЧИЖАЕВА<sup>1</sup>,  
М.Г. САУБЕНОВА<sup>1</sup>, Г.В. КЕРДЯШКИНА<sup>1</sup>, М.Е. ЕЛУБАЕВА<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК,  
Алматы, Казахстан

\* zhan98\_14@mail.ru

## ЭНДОФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, ПОВЫШАЮЩИЕ УСТОЙЧИВОСТЬ ПШЕНИЦЫ К ЗАСУХЕ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.06

### Аннотация

Регулярная периодичность и усиление засух вызывают серьезную озабоченность населения в Республике Казахстан и во всем мире. Оптимальной мерой предотвращения гибели сельскохозяйственных растений наряду с агротехническими мерами и селекцией засухоустойчивых сортов является использование препаратов на основе эндофитных микроорганизмов, обеспечивающих неспецифическую устойчивость растений. В данном исследовании был составлен перечень растений, произрастающих в черте города, характеризующихся высокой степенью засухоустойчивости. Из повсеместно представленного в засушливых местах обитания горца птичьего выделены эндофитные микроорганизмы. Вегетационные опыты показали повышение выживаемости пшеницы при имитации засухи в 2,5 раз у растений, обработанных эндофитами *Polygonum aviculare* с желтой и оранжевой окраской колоний. Указанные изоляты могут быть использованы в дальнейшей разработке микробных препаратов для повышения устойчивости растений к засухе.

**Ключевые слова:** эндофиты, засуха, неспецифическая устойчивость, пшеница, *Polygonum aviculare*

В последние годы засуха стала серьезной проблемой в Республике Казахстан и во всем мире в связи с изменением климатических условий [1-8]. За последние несколько десятков лет на территории Казахстана наблюдалось повсеместное повышение средней годовой и сезонных температур приземного воздуха. В среднем по Казахстану каждые 10 лет среднегодовая температура воздуха повышается на 0,27°C [9]. Частота сильных засух стремительно выросла. В следующем веке прогнозируется ускоренное расширение площади засушливых земель [10, 11]. Согласно отчету Организации Объединенных Наций, около 130 стран мира могут столкнуться с большой засухой уже в этом столетии, ожидаются частые и сильные засухи в большей части Африки, Центральной и Южной Америки, Центральной Азии, южной Австралии, Южной Европы, Мексики и Соединенных Штатов [12]. По данным ООН, нехватка воды и засуха нанесут ущерб человечеству в масштабах, сопоставимых с пандемией COVID-19, при этом риски возрастают по мере повышения глобальной температуры воздуха.

Атмосферные засухи наносят огромный урон сельскому хозяйству, вызывая гибель сельскохозяйственных растений и падеж скота, по цепочке влекущие за собой дальнейшие изменения в экономике и социальном благополучии. Регулярные засухи также способствуют дальнейшей деградации почв [13]. Необходимость принятия экстренных мер для улучшения прогнозирования засух, тщательного планирования и реализации мероприятий по сокращению их губительного воздействия и последствий очевидна.

Одним из способов повышения устойчивости растений к засухе наряду с созданием засухоустойчивых сортов и агротехническими приемами [14, 15] является использование

препаратов с микроорганизмами, обеспечивающих устойчивость растений к абиотическим стрессам, включая и засуху [16, 17]. Особый интерес в этом плане представляют эндофитные микроорганизмы, повышающие неспецифическую устойчивость растений [18-21]. Влияние микроорганизмов на устойчивость растений к засухе многостороннее. Оно включает: продукцию бактериальных экзополисахаридов, удерживающих влагу [17, 22, 23]; осмотическую адаптацию за счет продукции соединений осмопротекторов, таких как пролин, холин, галактинол и увеличения содержания общих растворимых сахаров в растениях [17, 24, 25]; синтез антиокислительных ферментов [26-28]; модуляцию уровней фитогормонов, в частности жасмоновой и абсцизовой кислот [24, 29-33]; повышение доступности питательных веществ [34]; синтез фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат деаминазы и снижение индуцированной стрессом продукции этилена [17]; эпигенетическую регуляцию ряда генов растений, связанных с абиотическим стрессом, отвечающих за закрытие устьиц, синтез антиокислительных ферментов и др. [17, 24, 34, 35–38]. К настоящему времени доказана более высокая эффективность эндофитов в сравнении с ризосферными микроорганизмами в стимуляции роста и защите растений [18, 20, 39–41].

Однако механизмы взаимодействия растений и эндофитных микроорганизмов полностью не изучены. К тому же для наиболее эффективного воздействия на сельскохозяйственные и садово-парковые растения необходимы изоляция и исследование местных штаммов.

Целью нашего исследования было выделение эндофитных микроорганизмов, связанных с местными растениями, хорошо выдерживающими засушливые условия, и определение их влияния на устойчивость к засухе важных сельскохозяйственных зерновых культур. На данном этапе в качестве объекта для выделения эндофитных микроорганизмов были исследованы виды урбанофлоры, способные к произрастанию как во влажных, так и в засушливых условиях.

### **Материалы и методы**

Растения для выделения эндофитных микроорганизмов отбирали с влажных (поливных территорий) и засушливых мест обитания Медеуского района города Алматы. Для отбора растений выбирали близкорасположенные участки с одинаковыми почвенными условиями, различающиеся лишь по степени увлажнения: регулярно орошаемые и неполивные засушливые территории.

Для выделения эндофитных микроорганизмов корни и стебли растений влажных и засушливых мест тщательно отмывали, ополаскивали стерильной водопроводной водой, разрезали на кусочки размером около 1 см, обрабатывали этанолом и раствором гипохлорита натрия и отмывали в стерильной водопроводной воде. Далее кусочки стебля и корня отдельно растирали в ступке, добавляли 1 мл стерильной воды и высевали на смесь сред (1:1): мясопептонный агар (Nutrient agar, TM-Media, India) и Сабуро (г/л: глюкоза 40,0; пептон 10,0; агар-агар 20,0). Для контроля часть цельных обработанных кусочков стебля и корня раскладывали на поверхность среды в чашках Петри. Посевы культивировали при 30°C в течение 48 ч. Затем производили сравнение состава эндофитной микрофлоры растений засушливых и влажных мест обитания и отсеивали изоляты, характерные для растений сухих почв.

Для определения влияния отобранных изолятов на способность растений пшеницы и ячменя противостоять засухе проводили вегетационные эксперименты. Почву, отобранную в городских условиях, просушивали, отвешивали по 200 г и помещали в стерилизованные этиловым спиртом пластиковые емкости диаметром 9 см. Семена фуражной пшеницы и ячменя (по 15 шт.) замачивали отдельно в течение 5 мин в суспензии отобранного микроорганизма с количеством клеток  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл и раскладывали на поверхности почвы. Сверху засыпали 30 г почвы и поливали водопроводной отстоявшейся водой в количестве 70 мл для прорастания семян. Посевы

оставляли при комнатной температуре 26 – 28°C. В дальнейшем полив сокращали до разовой дозы от 30 мл (первая неделя после прорастания) до 20 мл. Придерживались следующего графика поливов для растений пшеницы: 7-е сутки – 30 мл, 11-е сутки – 30 мл, 12-е сутки – 20 мл, 16-е сутки – 25 мл, 20 сутки – 25 мл. Ячмень дополнительно поливали на 15 сутки в количестве 25 мл и на 19 сутки в количестве 20 мл. Влагу распределяли равномерно по поверхности почвы. Отмечали степень усыхания и количество засохших и живых растений.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Составлен список сорных засухоустойчивых (ксеромезофитных) растений города Алматы. Выявлено 19 наименований растений, относящихся к 11 семействам. Наиболее широко было представлено семейство сложноцветных – 6 видов растений. Остальные семейства насчитывали преимущественно по одному представителю, единичные – по два (Таблица 1).

Таблица 1 – Ксеромезофитные растения города Алматы

Вид, лат. (рус.)	Семейство, лат. (рус.)
<i>Anisantha tectorum</i> (L.) Nevski (Неравноцветник кровельный)	<i>Poaceae</i> (Мятликовые)
<i>Arctium lappa</i> L. (Лопух большой)	<i>Asteraceae</i> (Сложноцветные)
<i>Artemisia absinthium</i> L. (Полынь горькая)	<i>Asteraceae</i> (Сложноцветные)
<i>Artemisia vulgaris</i> L. (Полынь обыкновенная)	<i>Asteraceae</i> (Сложноцветные)
<i>Asperugo procumbens</i> L. (Острица лежачая)	<i>Boraginaceae</i> (Бурачниковые)
<i>Cannabis sativa</i> L. (Конопля посевная)	<i>Cannabaceae</i> (Коноплевые)
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medikus (Пастушья сумка обыкновенная)	<i>Brassicaceae</i> (Капустные)
<i>Chenopodium album</i> L. (Марь белая)	<i>Chenopodiaceae</i> (Маревые)
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. (Бодяк полевой)	<i>Asteraceae</i> (Сложноцветные)
<i>Euphorbia esula</i> L. (Молочай острый)	<i>Euphorbiaceae</i> (Молочайные)
<i>Geum urbanum</i> L. (Гравилат городской)	<i>Rosaceae</i> (Шиповниковые)
<i>Lactuca serriola</i> L. (Латук компасный)	<i>Asteraceae</i> (Сложноцветные)
<i>Lycopsis orientalis</i> L. (Кривоцвет восточный)	<i>Boraginaceae</i> (Бурачниковые)
<i>Plantago lanceolata</i> L. (Подорожник ланцетный)	<i>Plantaginaceae</i> (Подорожниковые)
<i>Plantago major</i> L. (Подорожник большой)	<i>Plantaginaceae</i> (Подорожниковые)
<i>Poa bulbosa</i> L. (Мятлик луковичный)	<i>Poaceae</i> (Мятликовые)
<i>Polygonum aviculare</i> L. (Горец птичий)	<i>Polygonaceae</i> (Гречишные)
<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg. (Одуванчик лекарственный)	<i>Asteraceae</i> (Сложноцветные)
<i>Veronica persica</i> Poir. ex Lam. (Вероника персидская)	<i>Scrophulariaceae</i> (Норичниковые)

Для выделения эндофитных микроорганизмов был отобран горец птичий (*Polygonum aviculare* L.) как наиболее широко представленный повсеместно в различных районах города. Были отобраны растения с территорий различной степени увлажненности.

Растения горца птичьего поливаемых и засушливых территорий значительно различались по морфологии: длине и разветвленности стебля и корня, размерам листьев. Средняя длина корня горца птичьего, отобранного с засушливых мест, составила  $2,8 \pm 0,3$  см, стебля –  $6,9 \pm 0,3$  см ( $P < 0,001$ ). У растений поливаемых участков длина стебля характеризовалась значительно большими размерами  $12,2 \pm 2,2$  см, а средняя длина корня достигала –  $16,5 \pm 3,5$  см ( $P < 0,05$ ). При этом у растений, произрастающих в условиях засухи, отмечался только один побег без разветвлений и один основной корень с очень



мелкими боковыми корешками. На регулярно поливаемых участках у горца птичьего отмечалось 2 - 4 длинных побега и значительное разветвление корня с множеством мелких корешков.

Из отобранных растений были выделены эндофитные микроорганизмы. При сравнении состава эндофитов горца птичьего, произрастающего на поливаемых территориях, с эндофитами растений постоянно пересыхающих мест было отмечено наличие большого количества микроорганизмов с желтыми и оранжевыми колониями различных оттенков (Рисунок 1). Среди эндофитов растений влажных мест такие микроорганизмы не встречались. Были выделены два изолята, значительно различающихся по окраске колоний. Поскольку имеются данные о возможности влияния эндофитных микроорганизмов на растения различного систематического положения [42], были поставлены вегетационные опыты на зерновых культурах с использованием выделенных микроорганизмов.



Рисунок 1 – Эндофиты *Polygonum aviculare* с засушливых мест обитания

Семена пшеницы и ячменя обрабатывали суспензией микроорганизмов, высевали, однократно обильно поливали для проращивания и сокращали полив, начиная со второй недели от посева так, чтобы среднее количество осадков не превышало 5 мм в сутки (в соответствии с определением понятия атмосферная засуха [43]). Температура воздуха не превышала 25°C на протяжении 30 суток. Максимальная доза полива (30 мл) соответствовала 4,7 мм осадков, при этом полив осуществлялся через несколько дней. Среднее количество воды на протяжении 25 суток эксперимента (после прорастания семян) составило для пшеницы 5 мл в сутки, что соответствовало 0,64 мм осадков, а для ячменя 6,8 мл, соответственно 0,87 мм. Данный водный режим фактически соответствовал бездождному периоду, поскольку среднесуточное количество влаги не превышало 1 мм. Разовое количество осадков было менее 5 мм, то есть являлось неэффективным [44]. Все растения очень тяжело переживали имитацию засухи. Рост растений обычно отмечался только в периоды сразу после полива (при поливе в количестве 4,7 мм). В дальнейшем у пшеницы наблюдался частичный хлороз и скручивание листьев, увядание растений. При сокращении разового полива до 3,1 мм рост сильно замедлялся, происходило отмирание верхних частей листьев вплоть до полного засыхания растений (Рисунок 2).

Ячмень оказался более требовательным к поливу, вероятно вследствие большей ширины листьев и неспособности их к скручиванию при регулярном отсутствии влаги, поэтому ему потребовались дополнительные поливы. Но, несмотря на это, растения испытывали сильную нехватку влаги, отмечались частое полегание побегов и стойкий хлороз (данные не представлены).

При последующем поливе незасохшие части листьев пшеницы продолжали отрастать. При этом во все этапы культивирования наблюдался значительный защитный эффект использования изолятов *P. aviculare*. Высота растений превосходила таковую в контроле, засыхание верхушек листьев в первые две недели эксперимента было значительно менее выражено.



О - обработка суспензией изолята с оранжевыми колониями; Ж - обработка суспензией изолята с желтыми колониями; К - без обработки.

Рисунок 2 – Влияние эндофитных микроорганизмов *P. aviculare* на рост пшеницы в условиях имитации засухи

В дальнейшем после увядания поднималось значительно большее количество растений, чем в контроле. Уже на 22 сутки эксперимента погибло более 60% контрольных растений, листья же жизнеспособных растений у значительной части засохли на 50 – 70% длины. При этом растения, обработанные обоими изолятами бактерий, полностью сохранили жизнеспособность. В отдельных случаях было выявлено засушивание не более 1 см самой верхней части листьев. Через 24 суток количество растений, перенесших засуху, превосходило в опытном варианте контрольное в 2,5 раз.

По окончании эксперимента были выделены эндофитные микроорганизмы из корней и стеблей жизнеспособных растений пшеницы. В варианте с обработкой изолятом с оранжевыми колониями микроорганизмы с оранжевой окраской колоний не были замечены при расसेве. Но в варианте с обработкой «желтым» изолятом в корнях были выявлены окрашенные в желтый цвет колонии (Рисунок 3).

Отсутствие оранжево окрашенных колоний при высеве эндофитной микрофлоры через месяц культивирования после обработки изолятом может быть связано как с неспособностью его к проникновению внутрь растений пшеницы, так и с недостаточным сроком культивирования. Однако, несмотря на это, обработка суспензией изолята с оранжевыми колониями способствовала защите растений пшеницы от засухи.

Для ячменя защитный эффект не был показан. Отмечали лишь стимуляцию роста растений в самом начале жизненного цикла.



Рисунок 3 – Эндофитная микрофлора перенесших засуху растений пшеницы, обработанных перед посевом суспензией микроорганизмов с желтой окраской колоний

В целом проведенные исследования подтвердили эффективность эндофитных микроорганизмов для защиты растений от абиотических факторов. Поскольку микрофлора растений с засушливых мест отличалась от таковой на регулярно поливаемых территориях наличием микроорганизмов с желто-оранжевой пигментацией колоний, наиболее вероятно влияние на устойчивость растений именно каротиноидов микроорганизмов. Известно, что каротиноидные пигменты обладают антиоксидантными и фотозащитными свойствами [45, 46]. В последние годы показано, что летучие соединения, образующиеся вследствие окислительного распада каротиноидов растений, действуют в качестве стрессовых сигналов и участвуют в эпигенетической регуляции, вызывая перепрограммирование экспрессии генов в сторону активации механизмов клеточной защиты [47, 48]. Однако в этой области знаний к настоящему времени имеется еще слишком много пробелов [49]. В частности, не объяснено наличие очень большого количества различных регуляторов устойчивости у разных растений. Возможно, различия в химическом строении каротиноидов различных растений порождают разнообразие регуляторов, что может являться также причиной отсутствия защитного воздействия выделенных микроорганизмов на растения ячменя. Поэтому для защиты ячменя от засухи потребуется дополнительный скрининг эффективных эндофитных и микроорганизмов из других растений, в том числе непосредственно из ячменя.

Дальнейшая работа в этом направлении будет сосредоточена как на определении полного спектра сельскохозяйственных культур, на которые распространяется защитный эффект, так и на исследовании самих изолятов, включая соответствующие эксперименты, касающиеся их безопасности. В будущем данные перспективные изоляты могут быть использованы для разработки препаратов, способствующих защите сельскохозяйственных растений от засухи.

#### **Финансирование**

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

#### **Литература**

1 Засуха 2018 года привела к глобальному дефициту зерна. 08.04.2019. <https://vlast.kz/novosti/32581-zasuha-2018-goda-privela-k-globalnomu-deficitu-zerna.html> Дата обращения 19.09.2020.

2 В Казахстане соберут меньше пшеницы, чем хотели: сказалась засуха. 30 сентября 2019. URL: [https://forbes.kz//finances/markets/v\\_kazahstane\\_soberut\\_menshe\\_pshenitsyi\\_chem\\_sobiralis\\_skaz\\_alas\\_zasuha/](https://forbes.kz//finances/markets/v_kazahstane_soberut_menshe_pshenitsyi_chem_sobiralis_skaz_alas_zasuha/) Дата обращения 19.09.2020.

3 Васильев Е. Засуха в Казахстане: Зерна может не остаться? 27.07.2020. URL: <https://ia-centr.ru/experts/egor-vasilev/zasukha-v-kazahstane-zerna-mozhet-ne-ostatsya> Дата обращения 19.09.2020.

4 Назерке Курмангазинова, Алмас Кайсар. Выжить в засуху. Власть. URL: <https://vlast.kz/story/46102-vyzit-v-zasuhu.html> Дата обращения 01.10.2021.

5 Асылхан Мамашулы. Засуха в Казахстане: «Нужно признать джут и перейти к режиму чрезвычайной ситуации». 12 июля 2021. URL: <https://rus.azattyq.org/a/31353982.html> Дата обращения 01.10.2021.

6 Мейирим Смайыл. Засуха была ожидаема, но мы были не готовы - министр о гибели скота. 12 августа 2021. URL: [https://tengrinews.kz/kazakhstan\\_news/zasuha-ojidaema-myi-ne-gotovyiministr-gibeli-skota-445652](https://tengrinews.kz/kazakhstan_news/zasuha-ojidaema-myi-ne-gotovyiministr-gibeli-skota-445652) Дата обращения 01.10.2021.

7 Максим Блант. Жара ещё придёт. Каких последствий ждать от мировой засухи. Радио Свобода. 05 июля 2021. <https://www.svoboda.org/a/zhara-esche-pridet-kakih-posledstviy-zhdet-ot-mirovoi-zasuhi/31341712.html> Дата обращения 01.10.2021.

8 Амир Хайдаров. Ученые бьют тревогу: катастрофическая засуха угрожает всему миру. 29.09.2021. URL: <https://24.kz/ru/news/in-the-world/item/501243-uchenye-byut-trevogu-katastroficheskaya-zasukha-ugrozhaet-vsemu-miru> Дата обращения 01.10.2021.

9 Изменение климата. Национальный доклад о состоянии окружающей среды и об использовании природных ресурсов Республики Казахстан за 2016 год. Министерство энергетики Республики Казахстан. URL: <https://newecodoklad.ecogofond.kz/2016/izmenenie-klimata/> (дата обращения 01.10.2021).

10 Алексей Калмыков. Аномальное лето-2020: то потоп, то засуха. Ученые обещают планете новый рекорд потепления. 22 августа 2020. <https://www.bbc.com/russian/features-53856294>

11 Yao J., Liu H., Huang J., Gao Z., Wang G., Li D., Yu H., Chen X. Accelerated dryland expansion regulates future variability in dryland gross primary production // *Nat Commun.* – 2020. – Vol.11. – Article No. 1665. DOI: 10.1038/s41467-020-15515-2

12 Arthur Neslen. U.N. warns drought may be 'the next pandemic'. REUTERS. June 17, 2021. <https://www.reuters.com/article/us-un-drought-report-trfn-idUSKCN2DT1U6> Дата обращения 01.10.2021.

13 Hermans K., McLeman R. Climate change, drought, land degradation and migration: exploring the linkages // *Current opinion in environmental sustainability.* – 2021. – Vol. 50. – P. 236-244.

14 Шаповал О.А., Вакуленко В.В., Можарова И.П. Как повысить устойчивость растений к засухе // *Защита и карантин растений.* – 2011. - С. 61-62.

15 Zahra N., Wahid A., Hafeez M.B., Ullah A., Siddique K.H.M., Farooq M. Grain development in wheat under combined heat and drought stress: Plant responses and management // *Environmental and Experimental Botany.* – 2021. – Vol. 188. – Art. ID 104517. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104517

16 Kaushal M., Wani S.P. Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress // *Agriculture, Ecosystems & Environment.* – 2016. – Vol. 231. – P. 68-78. DOI:10.1016/j.agee.2016.06.031

17 Etesami H., Maheshwari D.K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* – 2018. – Vol. 156. – P. 225-246. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.013

18 Lata R., Chowdhury S., Gond S.K., White Jr. J.F. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes // *Lett Appl Microbiol.* – 2018. – Vol. 66(4). – P. 268-276. DOI: 10.1111/lam.12855

19 Rana K.L., Kour D., Sheikh I., Yadav N., Yadav A.N., Kumar V., Singh B.P., Dhaliwal H.S., Saxena A.K. Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications// In: Singh B. (eds) *Advances in Endophytic Fungal Research.* Fungal Biology. Springer, Cham, 2019. – P. 105-144.

20 Ullah A., Nisar M., Ali H., Hazrat A., Keerio A.A., Ihsan M., Laiq M., Ullah S., Fahad S., Khan A., Khan A.H., Akbar A., Yang X. Drought tolerance improvement in plants: an Endophytic bacterial approach // *Applied Microbiology and Biotechnology.* - 2019. – Vol. 103. – P. 7385-7397. DOI: 10.1007/s00253-019-10045-4

21 Hubbard M., Germida J.J., Vujanovic V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability // *Journal of Applied Microbiology.* – 2013. – Vol. 116. – P. 109-122. DOI: 10.1111/jam.12311

22 Timmusk S., Abd El-Daim I.A., Copolovici L., Tanilas T., Kannaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., et al. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh

- environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. - P. e96086. DOI:10.1371/journal.pone.0096086
- 23 Arora N.K., Fatima T., Mishra J., Mishra I., Verma S., Verma R., Verma M., Bhattacharya A., Verma P., Mishra P., Bharti C. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils // Journal of Advanced Research. - 2020. – Vol. 26. – P. 69-82. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.003
- 24 Sukkasem P., Kurniawan A., Kao T-C., Chuang Huey-wen. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance // Environmental and Experimental Botany. – 2018. - Vol. 155. – P. 541-551. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.08.005
- 25 Sarma R.K., Saikia R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21 // Plant Soil. – 2014. – Vol. 377. - P. 111-126.
- 26 Wang C.J., Yang W., Wang C., Gu C., Niu D.D., Liu H.X., Wang Y.P., Guo J.H. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. - P. e52565. DOI: 10.1371/journal.pone.0052565
- 27 Armada E., Roldan A., Azcon R. Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native *Lavandula* and *Salvia* plants species under drought conditions in natural arid soil // Microb. Ecol. – 2014. – Vol. 67. – P. 410-420. DOI: 10.1007/s00248-013-0326-9
- 28 Photolo M.M., Mavumengwana V., Sitole L., Tlou M.G. Antimicrobial and Antioxidant Properties of a Bacterial Endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, Isolated from *Combretum erythrophyllum* Seeds // International Journal of Microbiology. – 2020. – Vol. 2020. – Art. ID 9483670. DOI: 10.1155/2020/9483670
- 29 Liu F., Xing S., Ma H., Du Z., Ma B. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings // Applied Microbiology and Biotechnology. - 2013. – Vol. 97. - P. 9155–9164. DOI: 10.1007/s00253-013-5193-2
- 30 Kang S-M., Radhakrishnan R., Latif Khan A., Kim M-J., Park J-M., Kim B-R., Shin D-H., Lee I-J. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions // Plant Physiology and Biochemistry. – 2014. – Vol. 84. – P. 115-124. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.09.001
- 31 Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Shaposhnikov A.I., Azarova T.S., Makarova N.M., Davies W.J., Tikhonovich I.A. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*) // Annals of Applied Biology. – 2015. – Vol. 167, Issue1. – P. 11-25. DOI:10.1111/aab.12203
- 32 Cohen A.C., Bottini R., Pontin M., Berli F.J., Moreno D., Boccanlandro H., Travaglia C.N., Piccoli P.N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels // Physiologia Plantarum. – 2015. – Vol. 153, Issue 1. – P. 79-90. DOI: 10.1111/ppl.12221
- 33 Абизгильдина Р.Р. Индукция защитной системы пшеницы и картофеля эндوفитными бактериями *Vacillus subtilis* 26Д: дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.05/ФГБУ Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. – Уфа, 2012. – 142 с. - Инв. №005010927.
- 34 Hosseini F., Mosaddeghi M.R., Dexter A.R. Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses // Plant Physiology and Biochemistry. – 2017. – Vol. 118. – P. 107-120. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.06.005
- 35 Kim K., Jang S.M., Lee Y-J., Oh B.T., Chae J.C., Lee K.J. Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp: EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants // Mol. Cells. -2014. – Vol. 37. - P.109-117. DOI: 10.14348/molcells.2014.2239
- 36 Zhang H., Kim M.S., Sun Y., Dowd S.E., Shi H., Pare P.W. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter *HKT1* // Mol. Plant Microb. – 2008. – Vol. 21. - P. 737-744. DOI: 10.1094/MPMI-21-6-0737
- 37 Bokhari A., Essack M., Lafi F.F., Andres-Barrao C., Jalal R., Alamoudi S., Razali R., Alzubaidy H., Shah K.H., Siddique S., Bajic V.B., Hirt H., Saad M.M. Bioprospecting desert

plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – Art. No. 18154. DOI: 10.1038/s41598-019-54685-y

38 Sampangi-Ramaiah M.H., Jagadheesh, Dey P., Jambagi S., Vasantha Kumari M.M., Oelmüller R., Nataraja K.N., Ravishankar K.V., Ravikanth G., Shaanker R.U. An endophyte from salt-adapted Pokkali rice confers salt-tolerance to a salt-sensitive rice variety and targets a unique pattern of genes in its new host // *Scientific Reports.* – 2020. – Vol. 10. – Art. Number 3237. DOI: 10.1038/s41598-020-59998-x

39 Максимов И. В., Веселова С. В., Нужная Т. В., Сарварова Е. Р., Хайруллин Р. М. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам. // *Физиология растений.* -2015. – Т. 62, № 6. - С. 763–775. URL: [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_24149790\\_71902139.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_24149790_71902139.pdf)

40 Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes // *Microb. Mol. Biol. Rev.* - 2015. - Vol.79, No. 3. - P.293-320. DOI: 10.1128/MMBR.00050-14

41 Leach J.E., Triplett L.R., Argueso S.T., Trivedi P. Communication in the phytobiome // *Cell.* 2017. - Vol. 169, No. 4. - P. 587-596. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.025

42 Meng Q., Jiang H., Hao J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth: theory and applications in pest management // *Biological Control.* – 2016 – Vol. 98. – P. 18-26. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.03.010

43 Перечень и критерии опасных гидрометеорологических явлений по территории Архангельской области, акватории Белого и юго-востока Баренцева морей // Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северное управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды». URL: <http://www.sevmeteo.ru/weather/i/criteria-arh.pdf> (дата обращения 30.09.2021).

44 Пироговская Г.В. Поступление, потери элементов питания растений в системе «атмосферные осадки-почва-удобрение-растение». – Минск: Беларуская навука, 2017. – 227 с.

45 Поляков Н.В., Лёшина Т.В. Некоторые аспекты реакционной способности каротиноидов. Окислительно-восстановительные процессы и комплексообразование // *Успехи химии.* – 2006. – №75(12). – С. 1175-1192.

46 Nisar N., Li L., Lu S., Khin N.C., Pogson B.J. Carotenoid metabolism in plants // *Molecular Plant.* – 2015. - Vol. 8, Issue 1. – P. 68-82. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.03.010

47 Uarrota V., Stefen D., Leolato L., Medeiros Gindri D., Nerling D. Revisiting carotenoids and their role in plant stress responses: from biosynthesis to plant signaling mechanisms during stress // In: *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants/ Eds.: Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.* – Springer International Publishing AG, 2018. - P.207-232. DOI: 10.1007/978-3-319-75088-0\_10.

48 Navaux M. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants // *The Plant Journal.* – 2013. – Vol. 79. – P. 597-606. DOI: 10.1111/tbj.12386

49 Stanley L., Yuan Y.W. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus // *Front. Plant Sci.* – 2019. – Vol. 10. – Art. No. 1017. DOI: 10.3389/fpls.2019.01017



Е.А. ОЛЕЙНИКОВА<sup>1</sup>, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ\*<sup>1</sup>, А.В. КЕРДЯШКИН<sup>2</sup>,  
А.Ж. АЛЫБАЕВА<sup>1</sup>, А.А. АМАНГЕЛДІ<sup>1</sup>, А.В. ЧИЖАЕВА<sup>1</sup>,  
М.Г. САУБЕНОВА<sup>1</sup>, Г.В. КЕРДЯШКИНА<sup>1</sup>, М.Е. ЕЛУБАЕВА<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ҚР ЭГТРМ ОШЖДК "Ботаника және фитоинтродукция институты" ШЖҚРМК,  
Алматы, Қазақстан

\* zhan98\_14@mail.ru

## БИДАЙДЫҢ ҚҰРҒАҚШЫЛЫҚҚА ТӨЗІМДІЛІГІН АРТТЫРАТЫН ЭНДОФИТТІ МИКРООРГАНИЗМДЕР

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.06

### Түйін

Құрғақшылықтың күшеюі және оның тұрақты қайталуы Қазақстан Республикасының және бүкіл әлемде халықтың алаңдаушылығын тудырады. Ауылшаруашылық өсімдіктерінің тіршілігін сақтап қалудың оңтайлы шарасы агротехникалық шаралармен және құрғақшылыққа төзімді сорттарды таңдаумен қатар өсімдіктердің спецификалық емес тұрақтылығын қамтамасыз ететін эндофиттік микроорганизмдер негізіндегі препараттарды қолдану болып табылады. Бұл зерттеуде құрғақшылыққа төзімділіктің жоғары деңгейімен сипатталатын қала ішінде өсетін өсімдіктердің тізімі жасалды. Көптеген шөлейтті жерлерде өсетін құстаран( қызылтаспа) өсімдігінен эндофитті микроорганизмдер бөлініп алынды. Вегетативті тәжірибелер сары және қызғылт сары колониялары бар *Polygonum aviculare* эндофиттерімен өңделген өсімдіктерде құрғақшылық кезінде бидайдың өміршендігі 2,5 есе артқанын көрсетті. Бұл изоляттарды өсімдіктердің құрғақшылыққа төзімділігін арттыру үшін микробтық препараттарды одан әрі дамытуда қолдануға болады.

**Кілтті сөздер:** эндофиттер, құрғақшылық, спецификалық емес тұрақтылық, бидай, *Polygonum aviculare*.

IRSTI: 34.27.51, 68.03.07, 34.35.25, 34.29.35

Ye.A. OLENIKOVA<sup>1</sup>, Zh.N. YERMEKBAY\*<sup>1</sup>, A.V. KERDYASHKIN<sup>2</sup>,  
A.Zh. ALYBAYEVA<sup>1</sup>, A.A. AMANGELDI<sup>1</sup>, A.V. CHIZHAYEVA<sup>1</sup>,  
M.G. SAUBENOVA<sup>1</sup>, G.V. KERDYASHKINA<sup>1</sup>, M.Ye. YELUBAEVA<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> RSE REM «Institute of Botany and Phytointroduction» CFW GNR RK,  
Almaty, Kazakhstan

\* zhan98\_14@mail.ru

## ENDOPHYTIC MICROORGANISMS INCREASING WHEAT RESISTANCE TO DROUGHT

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.06

### Abstract

The regular recurrence and intensification of droughts are a serious concern for the population in the Republic of Kazakhstan and around the world. The optimal measure to prevent the death of agricultural plants, along with agricultural practices and selection of drought-resistant varieties, is the use of preparations based on endophytic microorganisms that provide nonspecific plant resistance. In this study, a list of plants growing within the city and characterized by a high degree of drought resistance was

compiled. Endophytic microorganisms have been isolated from the common knotgrass, which is ubiquitous in arid habitats. Vegetation experiments showed a 2.5-fold increase in the survival of wheat during drought simulation in plants treated with *Polygonum aviculare* endophytes with yellow and orange colonies. These isolates can be used in the further development of microbial preparations to increase plant resistance to drought.

**Key words:** endophytes, drought, non-specific resistance, wheat, *Polygonum aviculare*

In recent years, drought has become a serious problem in the Republic of Kazakhstan and around the world due to changing climatic conditions [1-8]. Over the past few decades, a widespread increase in the average annual and seasonal surface air temperatures has been observed on the territory of Kazakhstan. On average, in Kazakhstan, every 10 years, the average annual air temperature rises by 0.27°C [9]. The frequency of severe droughts has increased rapidly. In the next century, an accelerated expansion of the area of arid lands is predicted [10, 11]. According to a United Nations report, about 130 countries around the world could face major drought as early as this century, with frequent and severe droughts expected in much of Africa, Central and South America, Central Asia, southern Australia, southern Europe, Mexico, and the United States [12]. According to the UN, water shortages and drought will harm humanity on a scale comparable to the COVID-19 pandemic, with risks increasing as global air temperatures rise.

Atmospheric droughts cause enormous damage to agriculture, causing the death of agricultural plants and the loss of livestock, leading to further changes in the economy and social well-being along the chain. Regular droughts also contribute to further soil degradation [13]. The need for urgent action to improve drought forecasting, careful planning and implementation of measures to reduce their detrimental impact and consequences is obvious.

One of the ways to increase plant resistance to drought, along with the creation of drought-resistant varieties and agricultural practices [14, 15], is the use of preparations with microorganisms that provide plant resistance to abiotic stresses, including drought [16, 17]. Of particular interest in this regard are endophytic microorganisms that increase the nonspecific resistance of plants [18–21]. The influence of microorganisms on plant drought resistance is multifaceted. It includes the production of bacterial exopolysaccharides that retain moisture [17, 22, 23], osmotic adaptation due to the production of osmoprotective compounds such as proline, choline, galactinol and an increase in the content of total soluble sugars in plants [17, 24, 25], synthesis of antioxidant enzymes [26-28], modulation of the levels of phytohormones, in particular jasmonic and abscisic acids [24, 29-33], increased availability of nutrients [34], synthesis of the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and a decrease in stress-induced production of ethylene [17], epigenetic regulation of a number of plant genes associated with abiotic stress and responsible for stomatal closure, synthesis of antioxidant enzymes, etc. [17, 24, 34, 35-38]. To date, the higher efficiency of endophytes in comparison with rhizospheric microorganisms in promoting growth and protecting plants has been proven [18, 20, 39–41].

However, the mechanisms of interaction between plants and endophytic microorganisms have not been fully studied. In addition, for the most effective impact on agricultural and garden plants, isolation and study of local strains are necessary.

The aim of our study was to isolate endophytic microorganisms associated with native plants with good drought tolerance and to determine their effect on drought tolerance in important agricultural crops. At this stage, as an object for the isolation of endophytic microorganisms, urban flora species capable of growing both in wet and arid conditions were studied.

## Materials and Methods

Plants for the isolation of endophytic microorganisms were selected from wet (irrigated areas) and arid habitats of the Medeu district of Almaty city. For the selection of plants, closely



spaced areas with the same soil conditions were chosen, differing only in the degree of moisture: regularly irrigated and non-irrigated dry areas.

To isolate endophytic microorganisms, the roots and stems with leaves of plants from wet and dry places were thoroughly washed, rinsed with sterile tap water, cut into pieces about 1 cm in size, treated with ethanol and sodium hypochlorite solution, and washed in sterile tap water. Next, pieces of the stem and root were separately ground in a mortar, 1 ml of sterile water was added and inoculated on a mixture of media (1:1): meat-peptone agar (Nutrient agar, TM-Media, India) and Sabouraud (g/l: glucose 40, 0; peptone 10.0; agar-agar 20.0). As a control, part of the treated pieces of the stems and roots were laid out on the surface of the medium in Petri dishes. The crops were cultivated at 30°C for 48 h. Then, the compositions of the endophytic microflora of plants in dry and wet habitats were compared, and microorganisms characteristic of plants in dry soils were isolated.

Vegetation experiments were carried out to determine the effect of selected isolates on the ability of wheat and barley plants to withstand drought. The soil selected under urban conditions was dried, weighed in 200 g units, and placed in plastic containers 9 cm in diameter sterilized with ethyl alcohol. Feed wheat and barley seeds (15 pcs each) were moisten with suspensions of bacteria for 5 min ( $1 \times 10^9$  CFU/ml) and then laid out on the soil surface. Containers were topped with 30 g of soil and watered in an amount of 70 ml for seed germination. The inoculations were left at room temperature 26–28°C. Subsequently, watering was reduced to a single dose of 30 ml (the first week after germination) to 20 ml. The following irrigation schedule for wheat plants was adhered to: 7th day - 30 ml, 11th day - 30 ml, 12th day - 20 ml, 16th day - 25 ml, 20th day - 25 ml. Barley was additionally watered on the 15th day in the amount of 25 ml and on the 19th day in the amount of 20 ml. The moisture was distributed evenly over the soil surface. The degree of drying and the number of dried and living plants were noted.

Statistical data processing was carried out using Student's t-test.

### Results and Discussion

A list of weed drought-resistant (xeromesophytic) plants of Almaty city has been compiled. 19 names of plants belonging to 11 families have been identified. The most widely represented family was *Compositae* - 6 species of plants. The rest of the families consisted mainly of one or two representatives each (Table 1).

Table 1 - Xeromesophytic plants of the Almaty city

Species, lat. (English)	Family, lat. (English)
1	2
<i>Anisantha tectorum</i> (L.) Nevski (Drooping Brome)	<i>Poaceae</i> (Gramineae)
<i>Arctium lappa</i> L. (Greater burdock)	<i>Asteraceae</i> (Compositae)
<i>Artemisia absinthium</i> L. (Wormwood)	<i>Asteraceae</i> (Compositae)
<i>Artemisia vulgaris</i> L. (Common mugwort)	<i>Asteraceae</i> (Compositae)
<i>Asperugo procumbens</i> L. (Madwort)	<i>Boraginaceae</i> (Borage)
<i>Cannabis sativa</i> L. (Hemp)	<i>Cannabaceae</i> (Hemp family)
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medikus (shepherd's purse)	<i>Brassicaceae</i> (Cabbage family)
<i>Chenopodium album</i> L. (White goosefoot)	<i>Amaranthaceae</i> (Amaranth family)
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. (Field thistle)	<i>Asteraceae</i> (Compositae)
<i>Euphorbia esula</i> L. (Green spurge)	<i>Euphorbiaceae</i> (Spurge family)
<i>Geum urbanum</i> L. (Wood avens)	<i>Rosaceae</i> (Rose family)
<i>Lactuca serriola</i> L. (Prickly lettuce)	<i>Asteraceae</i> (Compositae)
<i>Lycopsis orientalis</i> L. (Buglosse d'Orient)	<i>Boraginaceae</i> (Borage)

Table 1 continuation

1	2
<i>Plantago lanceolata</i> L. (Ribwort plantain)	<i>Plantaginaceae</i> (Plantain family)
<i>Plantago major</i> L. (Broadleaf plantain)	<i>Plantaginaceae</i> (Plantain family)
<i>Poa bulbosa</i> L. (Bulbous bluegrass)	<i>Poaceae</i> (Gramineae)
<i>Polygonum aviculare</i> L. (Common knotgrass)	<i>Polygonaceae</i> (Knotweed family)
<i>Taraxacum officinale</i> F.H. Wigg. (Common dandelion)	<i>Asteraceae</i> (Compositae)
<i>Veronica persica</i> Poir. ex Lam. (Birdeye speedwell)	<i>Scrophulariaceae</i> (Figwort family)

To isolate endophytic microorganisms, we selected the common knotgrass (*Polygonum aviculare* L.) as the most widely represented everywhere in different parts of the city. Plants were selected from areas of varying degrees of moisture.

Knotweed plants of irrigated and arid territories differed significantly in morphology: by the length and branching of the stem and root, and by the size of the leaves. The average length of the Knotweed root, selected from arid places, was  $2.8 \pm 0.3$  cm, the stem was  $6.9 \pm 0.3$  cm ( $P < 0.001$ ). In plants of irrigated areas, the stem length was characterized by a significantly larger size of  $12.2 \pm 2.2$  cm, and the average root length reached  $16.5 \pm 3.5$  cm ( $P < 0.05$ ). At the same time, plants growing under drought conditions had only one shoot without branching and one main root with very small lateral roots. In regularly irrigated areas, the common knotgrass had 2-4 long shoots and a significant branching of the root with many small roots.

Endophytic microorganisms were isolated from the selected plants. When comparing the composition of endophytes of Knotweed, growing in irrigated areas, with endophytes of plants in constantly drying places, a large number of microorganisms with yellow and orange colonies of various shades was noted (Figure 1). Such microorganisms were not found among the endophytes of plants in wet places. Two isolates were isolated, differing significantly in the color of the colonies. Since there are data on the possibility of the influence of endophytic microorganisms on plants of different systematic positions [42], vegetation experiments were carried out on grain crops using isolated microorganisms.

Figure 1 - Endophytes of *Polygonum aviculare* from arid habitats

Wheat and barley seeds were treated with a suspension of microorganisms, sown, abundantly watered once for germination, and watering was reduced starting from the second week after sowing so that the average rainfall did not exceed 5 mm per day (in accordance with the definition of atmospheric drought [435]). The air temperature did not exceed 25°C for 30 days. The maximum dose of watering (30 ml) corresponded to 4.7 mm of precipitation, while watering was carried out after a few days. The average amount of water during the 25 days of the experiment (after seed germination) was 5 ml per day for wheat, which corresponded to 0.64 mm of precipitation, and for barley 6.8 ml, respectively 0.87 mm. This water regime actually corresponded to a rainless period, since the average daily amount of moisture did not exceed 1 mm. A single amount of precipitation was less than 5 mm, that is, it was ineffective [44]. All

plants had a very hard time simulating drought. Plant growth was usually observed only in the periods immediately after watering (when watering by 4.7 mm). Subsequently, partial chlorosis and twisting of leaves, and wilting of plants were observed in wheat. With a reduction in one-time watering to 3.1 mm, growth slowed down significantly, the upper parts of the leaves died off until the plants completely dried (Figure 2).

Barley proved to be more demanding on watering, probably due to the greater width of the leaves and their inability to curl in the regular absence of moisture, so it required additional watering. But, despite this, the plants experienced a severe lack of moisture, frequent lodging of shoots and persistent chlorosis were noted (data not shown).

During subsequent watering, the undried parts of the wheat leaves continued to grow. At the same time, a significant protective effect of the use of *P. aviculare* isolates was observed at all stages of cultivation. The height of the plants exceeded that in the control, the drying of the tops of the leaves in the first two weeks of the experiment was much less pronounced.

In the future, after wilting, a significantly larger number of plants rose than in the control. Already on the 22nd day of the experiment, more than 60% of the control plants died, while the leaves of viable plants in a significant part dried up by 50–70% of their length. At the same time, plants treated with both bacterial isolates completely retained their viability. In some cases, drying of no more than 1 cm of the uppermost part of the leaves was revealed. After 24 days, the number of plants that survived the drought exceeded the control variant by 2.5 times.

At the end of the experiment, endophytic microorganisms were isolated from the roots and stems of viable wheat plants. In the variant with orange colony isolate treatment, microorganisms with orange colonies were not observed during plating. However, in the variant with the treatment with the “yellow” isolate, yellow-colored colonies were detected in the roots (Figure 3).



Note - O - suspension treatment of isolate with orange colonies; Ж - suspension treatment of the isolate with yellow colonies; К - without processing.

Figure 2 - Influence of endophytic microorganisms *P. aviculare* on wheat growth under conditions of simulated drought

The absence of orange-colored colonies when seeding endophytic microflora a month after cultivation with the isolate may be due to both its inability to penetrate wheat plants and insufficient cultivation time. However, despite this, suspension treatment of the isolate with orange colonies contributed to the protection of wheat plants from drought.

No protective effect has been shown for barley. Only the stimulation of plant growth was noted at the very beginning of the life cycle.



Figure 3 - Endophytic microflora of drought-tolerated wheat plants treated before sowing with a suspension of microorganisms with yellow colonies

In general, the studies carried out confirmed the effectiveness of endophytic microorganisms in protecting plants from abiotic factors. Since the microflora of plants from dry places differed markedly from that in regularly watered areas by the presence of microorganisms with yellow-orange pigmentation of colonies, it is the carotenoids of microorganisms that are most likely to influence plant resistance. It is known that carotenoid pigments have antioxidant and photoprotective properties [45, 46]. In recent years, it has been shown that volatile compounds formed as a result of the oxidative breakdown of plant carotenoids act as stress signals and are involved in epigenetic regulation, causing reprogramming of gene expression towards activation of cellular defense mechanisms [47, 48]. However, there are still too many gaps in this area of knowledge [49]. In particular, the presence of a very large number of different resistance regulators in different plants has not been explained. It is possible that the differences in the chemical structure of carotenoids of different plants give rise to a variety of regulators, which may also be the reason for the lack of a protective effect of isolated microorganisms on barley plants. Therefore, to protect barley from drought, additional screening of effective endophytes and microorganisms from other plants, including directly from barley, will be required.

Further work in this direction will focus both on the identification of the full range of crops that are subject to the protective effect, and on the study of the isolates themselves, including appropriate experiments regarding their safety. In the future, these promising isolates can be used to develop preparations that can help to protect agricultural plants from drought.

### Funding

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

### References:

1 Zasuha 2018 goda privela k global'nomu deficitu zerna. 08.04.2019. <https://vlast.kz/novosti/32581-zasuha-2018-goda-privela-k-globalnomu-deficitu-zerna.html> Retrieved 19.09.2020.

2 V Kazahstane soberut men'she pshenicy, chem hoteli: skazalas' zasuha. September30, 2019.

URL:[https://forbes.kz//finances/markets/v\\_kazahstane\\_soberut\\_menshe\\_pshenitsyi\\_chem\\_sobiralis\\_skazalas\\_zasuha/](https://forbes.kz//finances/markets/v_kazahstane_soberut_menshe_pshenitsyi_chem_sobiralis_skazalas_zasuha/)? Retrieved 19.09.2020.



- 3 Vasil'ev E. Zasuha v Kazahstane: Zerna mozhet ne ostat'sja? 27.07.2020. URL: <https://ia-centr.ru/experts/egor-vasilev/zasukha-v-kazahstane-zerna-mozhet-ne-ostatsya> Retrieved 19.09.2020.
- 4 Nazerke Kurmangazinova, Almas Kajsar. Vyzhit' v zasuhu. Vlast'. URL: <https://vlast.kz/story/46102-vyzit-v-zasuhu.html> Retrieved 01.10.2021.
- 5 Asylhan Mamashuly. Zasuha v Kazahstane: «Nuzhno priznat' dzhut i perejti k rezhimu chrezvychajnoj situacii». July 12, 2021. URL: <https://rus.azattyq.org/a/31353982.html> Retrieved 01.10.2021.
- 6 Mejirim Smajyl. Zasuha byla ozhidaema, no my byli ne gotovy - ministr o gibeli skota. August 12, 2021. URL: Retrieved 01.10.2021.
- 7 Maksim Blant. Zhara eshho pridjot. Kakih posledstvij zhdet' ot mirovoj zasuhi. Radio Svoboda. July 05, 2021. Retrieved 01.10.2021.
- 8 Amir Hajdarov. Uchenye b'jut trevogu: katastroficheseskaja zasuha ugrozhaet vsemu miru. 29.09.2021. URL: <https://24.kz/ru/news/in-the-world/item/501243-uchenye-byut-trevogu-katastroficheseskaja-zasukha-ugrozhaet-vsemu-miru> Retrieved 01.10.2021.
- 9 Izmenenie klimata. Nacional'nyj doklad o sostojanii okruzhajushhej srede i ob ispol'zovanii prirodnyh resursov Respubliki Kazahstan za 2016 god. Ministerstvo jenergetiki Respubliki Kazahstan. URL: <https://newecodoklad.ecogofond.kz/2016/izmenenie-klimata> Retrieved 01.10.2021.
- 10 Aleksej Kalmykov. Anomal'noe leto-2020: to potop, to zasuha. Uchenye obeshhajut planete novyj rekord poteplenija. August 22, 2020. <https://www.bbc.com/russian/features-53856294>
- 11 Yao J., Liu H., Huang J., Gao Z., Wang G., Li D., Yu H., Chen X. Accelerated dryland expansion regulates future variability in dryland gross primary production. *Nat Commun.* 2020. Vol.11. Article No. 1665. DOI: 10.1038/s41467-020-15515-2
- 12 Arthur Neslen. U.N. warns drought may be 'the next pandemic'. REUTERS. June 17, 2021. <https://www.reuters.com/article/us-un-drought-report-trfn-idUSKCN2DT1U6> Retrieved 01.10.2021.
- 13 Hermans K., McLeman R. Climate change, drought, land degradation and migration: exploring the linkages // *Current opinion in environmental sustainability.* – 2021. – Vol. 50. – P. 236-244.
- 14 Shapoval O.A., Vakulenko V.V., Mozharova I.P. Kak povysit' ustojchivost' rastenij k zasuhe. *Zashhita i karantin rastenij.* 2011. S. 61-62.
- 15 Zahra N., Wahid A., Hafeez M.B., Ullah A., Siddique K.H.M., Farooq M. Grain development in wheat under combined heat and drought stress: Plant responses and management. *Environmental and Experimental Botany.* 2021. Vol. 188. Art. ID 104517. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2021.104517
- 16 Kaushal M., Wani S.P. Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* 2016. Vol. 231. P. 68-78. DOI:10.1016/j.agee.2016.06.031
- 17 Etesami H., Maheshwari D.K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2018. Vol. 156. P. 225-246. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.013
- 18 Lata R., Chowdhury S., Gond S.K., White Jr. J.F. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett Appl Microbiol.* 2018. Vol. 66(4). P. 268-276. DOI: 10.1111/lam.12855
- 19 Rana K.L., Kour D., Sheikh I., Yadav N., Yadav A.N., Kumar V., Singh B.P., Dhaliwal H.S., Saxena A.K. Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. In: Singh B. (eds) *Advances in Endophytic Fungal Research.* Fungal Biology. Springer, Cham., 2019. P. 105-144.
- 20 Ullah A., Nisar M., Ali H., Hazrat A., Keerio A.A., Ihsan M., Laiq M., Ullah S., Fahad S., Khan A., Khan A.H., Akbar A., Yang X. Drought tolerance improvement in plants: an Endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2019. Vol. 103. P. 7385-7397. DOI: 10.1007/s00253-019-10045-4
- 21 Hubbard M., Germida J.J., Vujanovic V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. *Journal of Applied Microbiology.* 2013. Vol. 116. P. 109-122. DOI: 10.1111/jam.12311
- 22 Timmusk S., Abd El-Daim I.A., Copolovici L., Tanilas T., Kannaste A., Behers L., Nevo E., Seisenbaeva G., et al. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. e96086. DOI:10.1371/journal.pone.0096086

23 Arora N.K., Fatima T., Mishra J., Mishra I., Verma S., Verma R., Verma M., Bhattacharya A., Verma P., Mishra P., Bharti C. Halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for improving productivity and remediation of saline soils. *Journal of Advanced Research*. 2020. Vol. 26. P. 69-82. DOI: 10.1016/j.jare.2020.07.003

24 Sukkasem P., Kurniawan A., Kao T-C., Chuang Huey-wen. A multifaceted rhizobacterium *Bacillus licheniformis* functions as a fungal antagonist and a promoter of plant growth and abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 2018. Vol. 155. P. 541-551. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.08.005

25 Sarma R.K., Saikia R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil*. 2014. Vol. 377. P. 111-126.

26 Wang C.J., Yang W., Wang C., Gu C., Niu D.D., Liu H.X., Wang Y.P., Guo J.H. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. e52565. DOI: 10.1371/journal.pone.0052565

27 Armada E., Roldan A., Azcon R. Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native *Lavandula* and *Salvia* plants species under drought conditions in natural arid soil. *Microb. Ecol*. 2014. Vol. 67. P. 410-420. DOI: 10.1007/s00248-013-0326-9

28 Photolo M.M., Mavumengwana V., Sitole L., Tlou M.G. Antimicrobial and Antioxidant Properties of a Bacterial Endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, Isolated from *Combretum erythrophyllum* Seeds. *International Journal of Microbiology*. 2020. Vol. 2020. Art. ID 9483670. DOI: 10.1155/2020/9483670

29 Liu F., Xing S., Ma H., Du Z., Ma B. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013. Vol. 97. P. 9155–9164. DOI: 10.1007/s00253-013-5193-2

30 Kang S-M., Radhakrishnan R., Latif Khan A., Kim M-J., Park J-M., Kim B-R., Shin D-H., Lee I-J. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014. Vol. 84. P. 115-124. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.09.001

31 Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Shaposhnikov A.I., Azarova T.S., Makarova N.M., Davies W.J., Tikhonovich I.A. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*. 2015. Vol. 167, Issue1. P. 11-25. DOI:10.1111/aab.12203

32 Cohen A.C., Bottini R., Pontin M., Berli F.J., Moreno D., Boccanlandro H., Travaglia C.N., Piccoli P.N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum*. 2015. Vol. 153, Issue 1. P. 79-90. DOI: 10.1111/ppl.12221

33 Abizgil'dina R.R. Indukcija zashhitnoj sistemy pshenicy i kartofelja jendofitnymi bakterijami *Bacillus subtilis* 26D: diss. ... kand. biol. nauk: 03.01.05/FGBU Institut biohimii i genetiki Ufimskogo nauchnogo centra RAN. Ufa, 2012. 142 s. Inv. №005010927.

34 Hosseini F., Mosaddeghi M.R., Dexter A.R. Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 118. P. 107-120. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.06.005

35 Kim K., Jang S.M., Lee Y-J., Oh B.T., Chae J.C., Lee K.J. Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp: EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Mol. Cells*. 2014. Vol. 37. P. 109-117. DOI: 10.14348/molcells.2014.2239

36 Zhang H., Kim M.S., Sun Y., Dowd S.E., Shi H., Pare P.W. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter *HKT1*. *Mol. Plant Microb*. 2008. Vol. 21. P. 737-744. DOI: 10.1094/MPMI-21-6-0737

37 Bokhari A., Essack M., Lafi F.F., Andres-Barrao C., Jalal R., Alamoudi S., Razali R., Alzubaidy H., Shah K.H., Siddique S., Bajic V.B., Hirt H., Saad M.M. Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Sci Rep*. 2019. Vol. 9. Art. No. 18154. DOI: 10.1038/s41598-019-54685-y

38 Sampangi-Ramaiah M.H., Jagadheesh, Dey P., Jambagi S., Vasantha Kumari M.M., Oelmüller R., Nataraja K.N., Ravishankar K.V., Ravikanth G., Shaanker R.U. An endophyte from salt-adapted

- Pokkali rice confers salt-tolerance to a salt-sensitive rice variety and targets a unique pattern of genes in its new host. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10. Art. Number 3237. DOI: 10.1038/s41598-020-59998-x
- 39 Maksimov I. V., Veselova S. V., Nuzhnaja T. V., Sarvarova E. R., Hajrullin R. M. Stimulirujushhie rost rastenij bakterii v regulacii ustojchivosti rastenij k stressovym faktoram. *Fiziologija rastenij*. 2015. T. 62, № 6. S. 763–775.  
URL: [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_24149790\\_71902139.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_24149790_71902139.pdf)
- 40 Haroim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 2015. Vol.79, No. 3. P. 293-320. DOI: 10.1128/MMBR.00050-14
- 41 Leach J.E., Triplett L.R., Argueso S.T., Trivedi P. Communication in the phytobiome. *Cell*. 2017. Vol. 169, No. 4. P. 587-596. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.025
- 42 Meng Q., Jiang H., Hao J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth: theory and applications in pest management. *Biological Control*. 2016 Vol. 98. P. 18-26. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.03.010
- 43 Perechen' i kriterii opasnyh gidrometeorologicheskikh javlenij po territorii Arhangel'skoj oblasti, akvatorii Belogo i jugo-vostoka Barenceva morej. Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie «Severnoe upravlenie po gidrometeorologii i monitoringu okruzhajushhej sredy». URL: <http://www.sevmeteo.ru/weather/i/criteria-arh.pdf> (дата обращения 30.09.2021).
- 44 Pirogovskaja G.V. Postuplenie, poteri jelementov pitaniya rastenij v sisteme «atmosfernye osadki-pochva-udobrenie-rastenie». Minsk: Belaruskaja navuka, 2017. 227 s.
- 45 Poljakov N.V., Ljoshina T.V. Nekotorye aspekty reakcionnoj sposobnosti karotinoidov. Okislitel'no-vosstanovitel'nye processy i kompleksoobrazovanie. *Uspехи химии*. 2006. №75(12). S. 1175-1192
- 46 Nisar N., Li L., Lu S., Khin N.C., Pogson B.J. Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*. 2015. Vol. 8, Issue 1. P. 68-82. DOI: 10.1016/j.molp.2014.12.007
- 47 Uarrota V., Stefen D., Leolato L., Medeiros Gindri D., Nerling D. Revisiting carotenoids and their role in plant stress responses: from biosynthesis to plant signaling mechanisms during stress. In: *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Eds.: Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F. Springer International Publishing AG, 2018. - P.207-232. DOI: 10.1007/978-3-319-75088-0\_10.
- 48 Havaux M. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal*. 2013. Vol. 79. P. 597-606. DOI: 10.1111/tpj.12386
- 49 Stanley L., Yuan Y.W. Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus. *Front. Plant Sci.* 2019. Vol. 10. Art. No. 1017. DOI: 10.3389/fpls.2019.01017

МРНТИ 68.41.35

З.А. ЛАТЫПОВА, Л.С. АУБЕКЕРОВА, Ш.Т. САРБАКАНОВА, Р.А. КЕРИМБАЕВА,  
Е.Б. ШАКИБАЕВ

ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», Алматы, Казахстан

### **ХАРАКТЕРИСТИКА *LISTERIA MONOCYTOGENES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЯСА РАЗНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ**

**doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.07**

#### **Аннотация**

Проведено исследование выделенных культур листерий из мяса животных, произведенного в разных областях Казахстана, изучены их культурально-морфологические, биохимические свойства и антибиоткорезистентность. Всего проанализировано 50 проб мяса разного вида (говядина, баранина, свинина, конина и курица). В исследуемых пробах мяса был обнаружен наиболее значимый для общественного здравоохранения патоген *Listeria monocytogenes*. Полученные культуры *Listeria monocytogenes* проверяли на антимикробную резистентность к 14



антибиотикам. Выделенная культура *Listeria monocytogenes* проявила устойчивость к 6 антибиотикам: ампициллину (10 мкг/диск), цефадроксилу (30 мкг/диск), тетрациклину (30 мкг/диск), амоксициллину (10 мкг/диск), цефиксиму (5 мкг/диск) и полимиксину -Б (100 мкг/диск).

**Ключевые слова:** пищевая безопасность, мясо, *Listeria monocytogenes*, культурально-морфологические, биохимические свойства, антибиотикорезистентность

В результате появления эмерджентных патогенов значительно возросли риски заболеваний, связанных с употреблением пищи, особенно у людей с ослабленным иммунитетом (дети, пожилые люди, онкобольные и т.д.). Одной из таких эмерджентных инфекций считается листериоз. *Listeria monocytogenes* является возбудителем листериоза у человека и животных. В настоящее время данное заболевание считается одним из наиболее значимых пищевых инфекций в мире. Основными факторами передачи листериоза являются молоко и молочные продукты, мясо животных и птиц, овощи и морепродукты [1,2,3,4,5,6]. *Listeria monocytogenes* может передаваться через обсемененные продукты питания на любом этапе их получения и переработки. Главную роль среди них играют молочные продукты, непастеризованное или некачественно пастеризованное молоко, сыры, масло и мороженое. Также контаминируются листериями пищевые продукты животного происхождения, обнаруживается патоген в варёных колбасах и сосисках, сыровяленых и сырокопчёных мясопродуктах, в полуфабрикатах.

В Республике Казахстан листериоз подлежит регистрации с 2002 года, с момента выхода приказа Министерства здравоохранения и Министерства сельского хозяйства № 946/326 «О профилактике листериоза в Республике Казахстан».

По данным Мусаевой А.К. с соавторами [7] в стационарно неблагополучных по листериозу животноводческих хозяйствах Алматинской области, имеющих крупный и мелкий рогатый скот, листериоз обнаруживается у 10–30 % исследованных животных. В Казахском научно-исследовательском ветеринарном институте из 10 проб, предоставленных из хозяйств Алматинской области, в 2009 году выделен возбудитель листериоза в двух случаях (от 7 месячного теленка и 2-хлетней коровы), в 2011 году – в двух случаях (от 3-хлетней коровы и годовалой овцы); в 2014 году – в трех случаях (от 6 месячного теленка, овцы и 8 месячного ягненка); а в 2015 году – в двух случаях (от коровы и быка-производителя), а в 2019 году – в десяти случаях (от телят, ягнят и свиней). В результате собственных исследований 50 проб мяса разного вида животных (говядина, баранина, свинина, конина и курица), произведенного в разных областях Казахстана (Алматинская, Западно-Казахстанская и Северо-Казахстанская области) в 8 пробах (3 пробы говядины, 4 пробы свинины и 1 проба баранины) была обнаружена *Listeria monocytogenes*.

Целью данного исследования было изучение свойств штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса разных видов животных.

### **Материалы и методы**

Диагностические препараты, питательные среды и реактивы: питательные среды (МПБ (мясо-пептонный бульон), МПА (мясо-пептонный агар), агар МПБ (мясо-пептонный бульон), МПА (мясо-пептонный агар), агар для идентификации листерий Palcam, кровяной агар, агар Мюллера-Хинтона, растворы красителей (окраска по Граму), среды Гисса, стерильная дистиллированная вода, физиологический раствор.

Изучение биологических свойств выделенных микроорганизмов проводили в соответствии с правилами работы, согласно утвержденным приказам и инструкциям к наборам.

Применялись следующие методы исследования: бактериологический, биохимический.

Всего для исследований отобрано 50 проб мяса разных видов животных (говядина,

баранина, свинина, конина и курица). Пробы мяса отбирались на рынках в соответствии с ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1-91).

Микробиологические исследования мяса проводили согласно ГОСТ Р 54354–2011 «Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа».

Отбор проб осуществляли из цельной туши в количестве 50 г. Далее из каждой пробы мяса из глубины мышечных волокон отбирали кусочки размером 1x1 см. Опытные образцы измельчали ножницами и растирали в ступке до гомогенного состояния. Навеску мяса помещали в пробирку с заранее приготовленным МПА и встряхивали. Полученную суспензию высеивали на чашки Петри с МПА. Чашки Петри с посевами помещали в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. После 24 часов культивирования из выращенного материала делали мазки и окрашивали по Граму. Для этого фиксированный мазок окрашивали карболовым раствором генцианового фиолетового в течение 1-2 минут. В течение 1 минуты обрабатывали мазок раствором Люголя, обесцвечивали спиртом в течение 10–20 сек, промывали водой. Затем окрашивали мазок водным раствором фуксина Пфейффера в течение 1–2 минуты.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводили диско-диффузным методом с применением бумажных дисков с антибиотиками и методом серийных разведений антибиотика в плотной среде (агар Мюллера-Хинтона) (МУК4.2 1890-04 МЗ РФ, 2004). Результаты интерпретировали согласно инструкции к дискам. Чувствительность антибиотиков оценивали по диаметру зоны задержки роста, на основании чего листерии характеризовали как чувствительные, умеренно чувствительные или устойчивые. Препараты для определения антибиотикорезистентности выбирали с учетом спектра антимикробной активности микроорганизмов, а также доступных и часто используемых в ветеринарной практике. Также учитывали природную устойчивость листерий к антибиотикам. После инкубации в течение 20 часов измеряли диаметр зоны торможения роста микроорганизма и относили выделенные микроорганизмы к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным к антибиотикам.

Для определения чувствительности к антибиотикам использовали суточную бульонную культуру листерий, не контаминированную посторонней микрофлорой. В работе использовали стандартные бумажные диски с антибиотиками: амикацином (30 мкг/диск), ампициллином (10 мкг/диск), цефадроксилем (30 мкг/диск), норфлоксацином (10 мкг/диск), клиндамицином (2 мкг/диск), тетрациклином (30 мкг/диск), ципрофлоксацином (5 мкг/диск), амоксициллином (10 мкг/диск), тобрамицином (10 мкг/диск), ломефлоксацином (10 мкг/диск), нитиллином (30 мкг/диск), офлоксацином (5 мкг/диск), цефиксимом (5 мкг/диск), полимиксином – Б (100 мкг/диск).

В стерильные чашки Петри диаметром 100 мм разливали по 25 мл МПА. Перед посевом чашки Петри с агаром выдерживали в термостате в течение 48 часов. Бактериальную суспензию (суточную бульонную культуру) в количестве 0,1 см<sup>3</sup> наносили на поверхность агара и равномерно распределяли шпателем, после чего стерильным пинцетом накладывали диски, пропитанные антибиотиками. В каждую чашку Петри помещали 7 дисков. После аппликации дисков чашки Петри инкубировали при температуре 37 °С в течение 18-20 часов. Оценку результатов проводили по наличию зон задержки роста микроорганизмов вокруг дисков. Отсутствие роста тест-организма на расстоянии более 15 мм от диска с антибиотиком указывало на чувствительность культуры к данному антибиотику [8]. 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.

### **Результаты и обсуждение**

Культурально-морфологические свойства. Колонии листерий на плотной питательной среде мелкие, с приподнятыми краями, с заостренным или приподнятым центром,

края колоний ровные, поверхность шероховатая с блестящим белым или голубоватым оттенком (S-форма) (рисунок 1).

Микроскопия мазков полученной культуры - мелкие грамположительные палочки с закругленными концами, расположенные попарно (рисунок 2).



Рисунок 1 - Рост *L. monocytogenes* на МПА

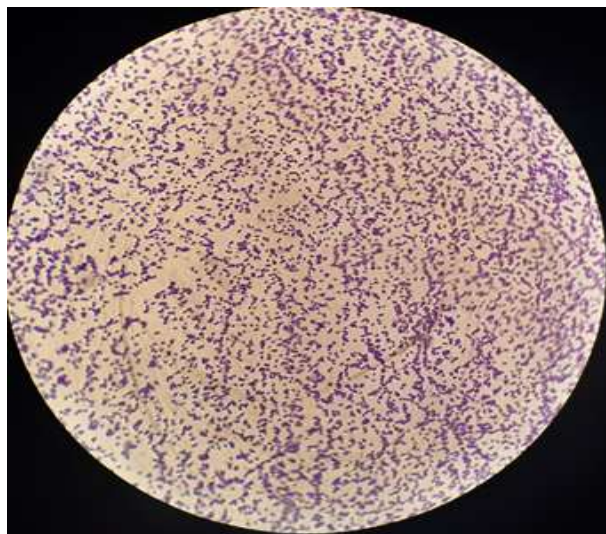


Рисунок 2 - *L. monocytogenes* в мазке, окрашенном по Граму

Через 24 ч после появления роста колоний производили пересев на селективную диагностическую среду Palsam. Через 24 часа инкубирования на селективной среде Palsam наблюдали обильный рост мелких, серовато-зелёных или оливково-зелёных колоний с чёрным ореолом, диаметром 0,5-1,0 мм. Через 48 часов колонии приобретали зеленую окраску, имели углубление, окруженное чёрным ореолом. При формировании сплошного роста производили пересев штрихами на 2-3 чашки Петри с селективной дифференциально-диагностической средой для получения изолированных колоний (рисунок 3).

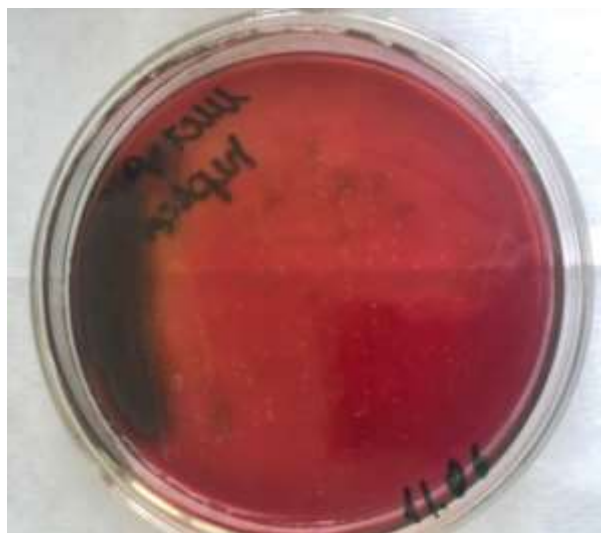


Рисунок 3 – Рост листерий на селективной среде Palsam

Биохимические свойства. У выделенных штаммов листерий выраженная каталазная активность (листерии расщепляли перекись водорода с образованием  $O_2$ ), штаммы

ферментировали глюкозу, мальтозу, манит. Бактерии не ферментировали лактозу, арабинозу, дульцит, инулин, сорбит, не образовывали индол и сероводород, не разжижали желатин, не восстанавливали нитраты в нитриты (рисунок 4).



Рисунок 4 - Биохимические свойства *L. monocytogenes* (1 - тест на каталазную активность, 2 - посев суточных культур на среды Гисса: слева направо: 1 - лактоза, 2 - манит, 3 – мальтоза, 4 - глюкоза)

Антибиотикочувствительность. Изучена чувствительность к 14 антибактериальным препаратам 8 штаммов листерий, выделенных из мяса. Результаты исследований приведены в таблице.

Таблица – Чувствительность к антибиотикам штаммов листерий, выделенных из мяса (говядина, свинина, баранина)

Антибиотик	Содержание в диске, мкг	Зона задержки роста, мм	Чувствительность
Амикацин АК <sup>30</sup>	30	22	Ч
Ампициллин АР <sup>10</sup>	10	-	Р
Цефадроксил СFR <sup>30</sup>	30	-	Р
Норфлоксацин NX <sup>10</sup>	10	23	Ч
Клиндамицин CD <sup>2</sup>	2	10	УЧ
Тетрациклин ТЕ <sup>30</sup>	30	-	Р
Ципрофлоксацин CFL <sup>5</sup>	5	20	Ч
Амоксициллин АХ <sup>10</sup>	10	-	Р
Тобрамицин ТОВ <sup>10</sup>	10	11	УЧ
Ломефлоксацин LOM <sup>10</sup>	10	22	Ч
Нитиллин NET <sup>30</sup>	30	15	УЧ
Офлосацин OF <sup>5</sup>	5	19	Ч
Цефиксим CFM <sup>5</sup>	5	-	Р
Полимиксин –Б РВ <sup>100U</sup>	100	-	Р
Примечание: Ч-чувствительный; УЧ- умеренно чувствительный			

Из таблицы видно, что все 8 штаммов *L. monocytogenes*, выделенные из мяса, проявили чувствительность к антибиотикам фторхинолонового ряда (норфлоксацину (10 мкг/диск), ломефлоксацину (10 мкг/диск), офлосацину (5 мкг/диск) и аминогликозидам (амикацину (30 мкг/диск)), умеренно чувствительны к клиндамицину (2 мкг/диск), тобрамицину (10 мкг/диск), нитиллину (30 мкг/диск). 3 культуры листерий проявили резистентность к ампициллину (10 мкг/диск), 1 - цефадроксилу (30 мкг/диск), 1-тетрациклину (30 мкг/диск), 2- амоксициллину (10 мкг/диск), 1 -цефиксиму (5 мкг/диск) и 1 - полимиксину (100 мкг/диск).

**Заклучение.** Все выделенные штаммы *Listeria* обладали типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами (характер роста, морфология патогена, биохимические свойства). Установлена резистентность листерий к 6 антибиотикам: ампициллину, цефадроксилу, тетрациклину, амоксициллину, цефиксиму, полимиксину - Б.

Присутствие *Listeria* в образцах мяса, наличие антибиотикорезистентности у штаммов свидетельствует о высокой опасности мясной продукции для здоровья людей.

### **Финансирование**

Работа выполнена в рамках ПЦФ МСХ РК (2018-2020 гг.) по проекту «Разработать программу контроля пищевой безопасности животноводческой продукции на всех стадиях непрерывной цепочки «производство - потребление».

### **Литература:**

- 1 Ефимочкина Н.Р. Некоторые закономерности появления эмерджентных пищевых патогенов // Вопросы питания, 2006. Т.75, № 4. С. 9-15.
- 2 Листерия, передаваемый через продукты питания // Бюллетень ВОЗ. 1988. Т.66; С.1-4.
- 3 Кнize А.В., Бузун А.И., Шарма Р.К. Эпизоотическая ситуация по листериозу в странах мира и России // Материалы Международного симпозиума "Листерия на рубеже тысячелетий". Российская Академия сельскохозяйственных наук. ВНИИВМ. Покров. 1999. С. 118–123. 2.
- 4 Котляров В.М. Проблема листериоза на рубеже тысячелетий // Там же. С. 48–52.
- 5 Зайцева Е.А., Федянина Л.Н. О неспецифической профилактике листериоза // Тихоокеанский медицинский журнал, Владивосток, 2010, №4, С. 5-7.
- 6 Пискунов А.В. Усовершенствование методов выделения и идентификации *Listeria monocytogenes* // Дисс. на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук, Владимир, 2013, с.27.
- 7 Мусаева А.К., Егорова Н.Т., Даугалиева А.Т., Досанова А.К. Диагностика листериоза животных и биологические свойства листерий // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Москва, 2016, № 3.
- 8 Карпов Т.И., Ермолева С.А., Лопырев И.В. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001, № 3. – С. 266–273.

З.А. ЛАТЫПОВА, Л.С. АУБЕКЕРОВА, Ш.Т. САРБАКАНОВА, Р.А. КЕРИМБАЕВА,  
Е.Б. ШАКИБАЕВ

ТОО «Қазақ ветеринария ғылыми-зерттеу институты»,  
Алматы қ. Қазақстан

## **ӘР ТҮРЛІ ЖАНУАРЛАРДЫҢ ЕТІНЕН БӨЛІНГЕН *LISTERIA MONOCYTOGENES*- ТІҢ СИПАТТАМАСЫ, АЛМАТЫ**

### **Түйін**

Сипаттамалық зерттеу Қазақстанның әр түрлі аймақтарында өндірілген жануарлар етінен бөлінген листерий штаммдарын бөліп алу, анықтау және сипаттау мақсатында жүргізілді. Барлығы 50 түрлі сынама талданды (сиыр еті, қой еті, шошқа еті, жылқы еті және тауық еті). Алынған сынамаларда қоғамдық денсаулыққа әсері жоғары *Listeria monocytogenes* патогені анықталды. Алынған *Listeria monocytogenes* культурасын 14 түрлі антибиотикке қарсы төзімділігі тексерілді. Листерийден бөлінген культура 6 антибиотиктерге төзімділік көрсетті: ампициллин (10 мкг/диск), цефадроксил (30 мкг/диск), тетрацилин (30 мкг/диск), амоксициллин (10 мкг/диск), цефиксим (5 мкг/диск), полимиксин-6 (100 мкг/диск).

**Кілтті сөздер:** тағам қауіпсіздігі, ет, *Listeria monocytogenes*, антибиотикке төзімділік.

IRSTI: 68.41.35

Z.A. LATYPOVA, L.S. AUBEKEROVA, Sh.T. SARBAKANOVA, R.A. KERIMBAYEVA,  
E.B. SHAKIBAEV

LLP «Kazakh Scientific Research Veterinary Institute», Almaty, Kazakhstan

## CHARACTERISTICS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATED FROM MEAT OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES, ALMATY

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.07

### Abstract

A study of the isolated listeria culture obtained from animal meat produced in different regions of Kazakhstan was conducted, their cultural-morphological, biochemical properties and antibiotic resistance were studied. In total, 50 samples of meat of various types (beef, lamb, pork, horse meat and chicken) were analyzed. The pathogen *Listeria monocytogenes*, the most significant for public health, was found in the studied meat samples.

The obtained cultures of *Listeria monocytogenes* were tested for antimicrobial resistance to 14 antibiotics. The isolated culture of *Listeria monocytogenes* showed resistance to 6 antibiotics: ampicillin (10 mcg/disc), cefadroxyl (30 mcg/disc), tetracycline (30 mcg/disc), amoxicillin (10 mcg/disc), cefixim (5 mcg/disc) and polymyxin-B (100 mcg/disc).

**Key words:** food safety, meat, *Listeria monocytogenes*, cultural-morphological, biochemical properties, antibiotic resistance.

Because of the appearance of emergent pathogens, the risks of diseases associated with food consumption have significantly increased, especially in people with weakened immunity (children, the elderly people, cancer patients, etc.). Listeriosis is considered one of such emergent infections. *Listeria monocytogenes* is the causative agent of listeriosis in humans and animals. Currently, this disease is considered one of the most significant food infections in the world. The main factors of listeriosis transmission are milk and dairy products, animal and poultry meat, vegetables and seafood [1, 2, 3, 4, 5, 6]. *Listeria monocytogenes* can be transmitted through seeded foods at any stage of their production and processing. Dairy products, unpasteurized or poorly pasteurized milk, cheese, butter and ice cream play the main role among them. Food products of animal origin are also could be contaminated with listeria; a pathogen is found in boiled sausages and sausages, dried and smoked meat products, in semi-finished products.

In the Republic of Kazakhstan, listeriosis has been subject to registration since 2002, since the release of the order of the Ministry of Health and the Ministry of Agriculture No. 946/326 “On the prevention of listeriosis in the Republic of Kazakhstan”;

According to Musayeva A.K. and co-authors, listeriosis is found in 10-30% of the animals studied in livestock farms in Almaty region that are permanently disadvantaged by listeriosis, having large and small cattle. In the Kazakh Scientific Research Veterinary Institute, from 10 samples provided from farms of the Almaty region of the Republic of Kazakhstan in 2009, the causative agent of listeriosis was isolated in two cases (from a 7-month-old calf and a 2-year-old cow), in 2011 - in two cases (from a 3-year-old cow and a one-year-old sheep); in 2014 – in three cases (from a 6-month-old calf, sheep and 8-month-old lamb); and in 2015 - in two cases (from a cow and a bull-producer), and in 2019 - in 10 cases (from calves, lambs and pigs). As a result of our own research, 50 samples of meat of different types of animals (beef, lamb, pork, horse meat and chicken) produced in different regions of Kazakhstan (Almaty, West Kazakhstan and North Kazakhstan regions) in 8 samples (3 samples of beef, 4 samples of pork and 1 sample of lamb) *Listeria monocytogenes* was detected.

The purpose of this study was to investigation the properties of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat of different animal species.

## Materials and methods

Diagnostic preparations, nutrient media and reagents: nutrient media (MPB (meat-peptone broth), MPA (meat-peptone agar), MPB agar (meat-peptone broth), MPA (Meat-peptone agar), Palcam Listeria Identification Agar, Blood Agar, Muller-Hinton agar, Dye solutions (Gram staining), Hiss media, sterile distilled water, saline solution.

The study of the biological characteristics of the isolated microorganisms was carried out in accordance with the rules of operation, according to the approved orders and instructions for the kits.

The following research methods were used: bacteriological, biochemical.

In total, 50 samples of meat of different animal species (beef, lamb, pork, horse meat and chicken) were selected for research. Meat samples were taken in the markets in accordance with GOST R 51447-99 (ISO 3100-1-91).

Microbiological studies of meat were carried out according to GOST R 54354-2011 "Meat and meat products. General requirements and methods of microbiological analysis".

Sampling was carried out from a whole carcass in the amount of 50 g. Further, pieces of 1x1 cm in size were taken from each meat sample from the depth of muscle fibers. The prototypes were crushed with scissors and ground in a mortar to a homogeneous state. The meat sample was placed in a test tube with pre-prepared BCH and shaken. The resulting suspension was sown on Petri dishes with MPA. Petri dishes with crops were placed in a thermostat for 24 hours at a temperature of 37 ° C. After 24 hours of cultivation, smears were made from the grown material and colored according to Gram. To do this, a fixed smear was stained with a carbolic solution of gentian violet for 1-2 minutes. The smear was treated with Lugol solution for 1 minute, discolored with alcohol for 10-20 seconds, washed with water. Then the smear was stained with an aqueous solution of fuchsin Pfeiffer for 1-2 minutes.

Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics was carried out by the disco-diffuse method using paper disks with antibiotics and the method of selective dilution of an antibiotic in a dense medium (Muller-Hinton agar) (MUK4.2 1890-04 of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2004). The results were interpreted according to the instructions for the disks. The sensitivity of antibiotics was assessed by the diameter of the growth retardation zone, on the basis of which listeria was characterized as sensitive, moderately sensitive or resistant. Preparations for the determination of antibiotic resistance were selected taking into account the spectrum of antimicrobial activity of microorganisms, as well as available and frequently used in veterinary practice. The natural resistance of listeria to antibiotics was also taken into account. After incubation, the diameter of the microbial growth inhibition zone was measured for 20 hours and the isolated microorganisms were classified as sensitive, moderately sensitive or resistant to antibiotics.

To determine the sensitivity to antibiotics, a daily broth culture of listeria was used, which was not contaminated with extraneous microflora. Standard paper discs with antibiotics were used in the work: amikacin (30 mcg/disc), ampicillin (10 mcg/disc), cefadroxyl (30 mcg/disc), norfloxacin (10 mcg/disc), clindamycin (2 mcg/disc), tetracycline (30 mcg/disc), ciprofloxacin (5 mcg/disc), amoxicillin (10 mcg/disc), tobramycin (10 mcg/disc), lomefloxacin (10 mcg/disc), nitillin (30 mcg/disc), ofloxacin (5 mcg/disc), cefixim (5 mcg/disc), polymixin –B (100 mcg/disc).

25 ml MPA were poured into sterile Petri dishes with a diameter of 100 mm. Before sowing, Petri dishes with agar were kept in a thermostat for 48 hours. Bacterial suspension (daily broth culture) in an amount of 0.1 cm<sup>3</sup> was applied to the surface of the agar and evenly distributed with a spatula, after which disks impregnated with antibiotics were applied with sterile tweezers.

7 discs were placed in each Petri dish. After applying the discs, Petri dishes were incubated at a temperature of 37 ° C for 18-20 hours upside down. The results were evaluated based on the presence of microbial growth retardation zones around the disks. The absence of growth of the test organism at a distance of more than 15 mm from the disk with the antibiotic indicated the



sensitivity of the culture to this antibiotic [7, 8]. If the test microorganism developed in the immediate vicinity of a disk impregnated with an antibiotic, that this microorganism was evaluated as resistant to its action. The diameter of the growth retardation zones, taking into account the diameter of the disk itself, was measured with an accuracy of 1 mm.

### Results and discussion

Cultural and morphological properties. *Listeria* colonies on a dense nutrient medium are small, with raised edges, with a pointed or raised center, the edges of the colonies are smooth, the surface is rough with a shiny white or bluish tint (S-shape) (Figure 1).

Microscopy of smears of the resulting culture - small gram-positive rods with rounded ends arranged in pairs. (Figure 2).



Figure 1 - Growth of *L.monocytogenes* by MPA

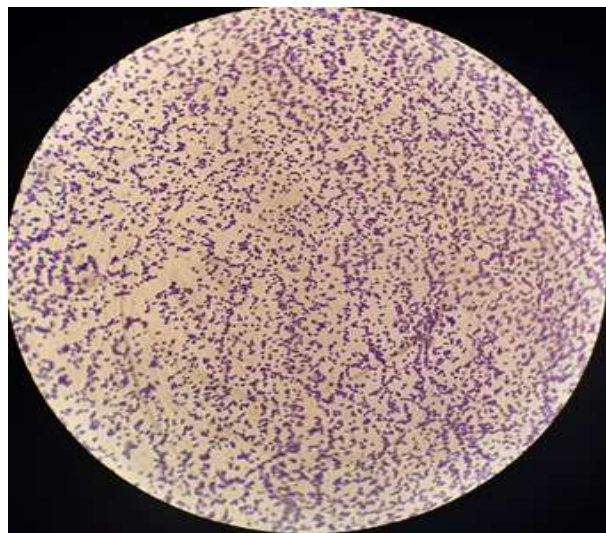


Figure 2 - *L. monocytogenes* in a Gram-stained smear

24 hours after the appearance of colony growth, transplanting was performed on a selective diagnostic medium Palkam. After 24 hours of incubation on a selective medium of Palkam, abundant growth of small, grayish-green or olive-green colonies with a black halo, 0.5-1.0 mm in diameter, was observed. After 48 hours, the colonies acquired a green color, had a recess surrounded by a black halo. During the formation of continuous growth, strokes were transplanted into 2-3 Petri dishes with a selective differential diagnostic medium to obtain isolated colonies (Figure 3).



Figure 3 – *Listeria* growth on selective Palkam medium

Biochemical properties. The isolated strains of listeria have pronounced catalase activity (listeria split hydrogen peroxide to form O<sub>2</sub>), the strains fermented glucose, maltose, manitol. The bacteria did not ferment lactose, arabinose, dulcitate, inulin, sorbitol, did not form indole and hydrogen sulfide, did not dilute gelatin, did not reduce nitrates to nitrites (Figure 4).



Figure 4 - Biochemical characteristics of *L. monocytogenes* (1 - test for catalase activity, 2 - sowing of daily crops on Gis media: from left to right: 1 - lactose, 2 - manitol, 3 - maltose and 4 - glucose)

Antibiotic sensitivity. Sensitivity to 14 antibacterial drugs of 8 strains of listeria isolated from meat was studied. The results of the studies are shown in the table.

Table – Antibiotic sensitivity of listeria strains isolated from meat (beef, pork, lamb)

Antibiotic	The content in the disk, mcg	Growth retardation zone, mm	Sensitivity
Amikacin AK <sup>30</sup>	30	22	S
Ampicillin AR <sup>10</sup>	10	-	R
Cefadroxyl CFR <sup>30</sup>	30	-	R
Norfloxacin NX <sup>10</sup>	10	23	S
Clindamycin CD <sup>2</sup>	2	10	MS
Tetracycline TE <sup>30</sup>	30	-	R
Ciprofloxacin CFL <sup>5</sup>	5	20	S
Amoxicillin AX <sup>10</sup>	10	-	R
Tobramycin TOB <sup>10</sup>	10	11	MS
Lomefloxacin LOM <sup>10</sup>	10	22	S
Nitillin NET <sup>30</sup>	30	15	MS
Ofloxacin OF <sup>5</sup>	5	19	S
Cefixime CFM <sup>5</sup>	5	-	R
Polymyxin-B PB <sup>100U</sup>	100	-	R

Note: S-sensitive;  
MS- moderately sensitive;  
R - resistant.

The table shows that all 8 strains of *L. Monocytogenes* isolated from meat showed sensitivity to fluoroquinolone antibiotics (norfloxacin (10 mcg/disc), lomefloxacin (10 mcg/disc), ofloxacin (5 mcg/disc) and aminoglycosides (amikacin (30 mcg/disc)), moderately sensitive to clindamycin (2 mcg/disc), tobramycin (10 mcg/disc), nitillin (30 mcg/disc). 3 listeria cultures showed resistance to ampicillin (10 mcg/disc), 1 - cefadroxyl (30 mcg/disc), 1- tetracycline (30 mcg/disc), 2- amoxicillin (10 mcg/disc), 1 -cefixim (5 mcg/disc) and 1 - polymyxin (100 mcg/disc).

**Conclusion.** All isolated *Listeria* strains had typical cultural-morphological and biochemical properties (growth pattern, pathogen morphology, biochemical properties). *Listeria* resistance to 6 antibiotics has been established: ampicillin, cefadroxyl, tetracycline, amoxicillin, cefixim, polymyxin - B.

The presence of *Listeria* in meat samples, the presence of antibiotic resistance in strains, indicates a high risk to human health of meat products sold on the markets.

#### **Financing**

The work was carried out within the framework of the targeted financing program of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (2018-2020) under the project "To develop a program for monitoring the food safety of livestock products at all stages of the continuous chain "production - consumption".

#### **References:**

- 1 Efimochkina N.R. Nekotorye zakonomernosti pojavlenija jemerdzhentnyh pishhevnyh patogenov; Voprosy pitaniya, 2006. T.75, № 4. S. 9; 15.
- 2 Listerioz, peredavaemyj cherez produkty pitaniya; Bjulleten' VOZ. 1988. T.66; S.1;4.
- 3 Knize A.V., Buzun A.I., Sharma R.K. Jepizooticheskaja situacija po listeriozu v stranah mira i Rossii; Materialy Mezhdunarodnogo simpoziuma "Listerioz na rubezhe tysjacheletij". Rossijskaja Akademija sel'skohozjajstvennyh nauk. VNIIVVM. Pokrov. 1999. S. 118;123. 2.
- 4 Kotljarov V.M. Problema listerioza na rubezhe tysjacheletij; Tam zhe. S. 48;52.
- 5 Zajceva E.A., Fedjanina L.N. O nespecificheskoj profilaktike listerioza; Tihookeanskij medicinskij zhurnal, Vladivostok, 2010, №4, S. 5;7.
- 6 Piskunov A.V. Uovershenstvovanie metodov vydelenija i identifikacii *Listeria monocytogenes*; Diss. na soiskanie uchenoj stepeni kandidata veterinarnykh nauk, Vladimir, 2013, s.27.
- 7 Musaeva A.K., Egorova N.T., Daugalieva A.T., Dosanova A.K. Diagnosis of animal listeriosis and biological properties of *Listeria* // International Journal of Applied and Fundamental Research. Moscow, 2016, No. 3.
- 9 Karpov T.I, Ermoleva S.A., Lopyrev I.V. Novye metody identifikacii *Listeria monocytogenes*; Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.; 2001, № 3.; S. 266; 273.

МРНТИ 34.27.17

И.Э.СМИРНОВА, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА, Л.Г. ТАТАРКИНА,  
Г.Б. БАЙМАХАНОВА, Г.А. СПАНКУЛОВА  
ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

### ВЛИЯНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ НА ВСХОЖЕСТЬ СЕМЯН И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ДОННИКА И ЛЮЦЕРНЫ

**doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.08**

#### **Аннотация**

Изучено влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть и развитие разных сортов донника и люцерны. Установлено, что обработка семян целлюлолитическими бактериями повышает всхожесть семян донника до 63,8%, люцерны - до 89% и стимулирует рост и развитие растений. При этом, длина стебля донника увеличилась в 1,6-2,8 раза, корня - в 2,1-4,8 раза, длина стебля люцерны - в 1,7-3,7 раза, корня - в 3,1-5,4 раза. По результатам исследований отобраны наиболее активные штаммы: три штамма - для донника и четыре - для люцерны.

**Ключевые слова:** целлюлолитические бактерии, донник, люцерна, семена, всхожесть, стимуляция роста

Традиционной отраслью Агропромышленного комплекса (АПК) нашей республики является животноводство. Основным фактором, сдерживающим развитие этой отрасли, является недостаточность кормовой базы [1]. В Казахстане одними из основных кормовых культур являются люцерна и донник, которые возделываются на зерно и зеленую массу. Трава донника и люцерны характеризуется высоким содержанием протеина, в состав которого входят основные незаменимые аминокислоты (лизин, валин, триптофан, метионин и др.). Их количественное содержание в белке этих культур в 1,5–3,0 раза выше, чем в белке зерновых [2]. Также, кормовые культуры способны активно фиксировать азот атмосферы и оставлять с пожнивными остатками в почве до 40–100 кг/га азота, что приравнивается к 10–20 т/га навоза [3]. В будущем эти культуры будут занимать ведущее место в биологическом земледелии для поддержания плодородия почв [4,5]. В то же время состояние кормовой базы Казахстана показывает, что доля кормовых культур в севообороте составляет всего 15%, что в 2 раза ниже рекомендованного, и из-за низкой урожайности культур, существующих посевов недостаточно для развития животноводства Казахстана [6,7].

Одной из причин низкой урожайности кормовых культур является плохая всхожесть семян, что связано с биологической особенностью их строения. Часть семян донника и люцерны имеет непроницаемую для воды и воздуха оболочку, из-за которой семена не могут прорасти сразу после посева. Это свойство называется твердоканальностью семян. Донник и люцерна содержат до 30–70% таких семян [8]. При посеве из-за твердой оболочки семена не дают дружных всходов, что создает разреженность посевов и значительно снижает урожайность зеленой массы этих культур с единицы площади [9].

Для повышения всхожести семян донника и люцерны чаще всего используют скарификацию, при которой семена пропускают через специальные машины-скарификаторы [10,11]. Этот метод требует специального оборудования, больших затрат энергии и труда. Кроме того, механическое воздействие вызывает повреждение не только оболочки, но и зародыша семени, что приводит к его поражению микробами, плесневению и загниванию, в результате чего значительная часть посевного материала пропадает [12]. Также этот способ требует больших материальных и энергетических затрат, специального оборудования. В этой связи, разработка доступного и эффективного способа повышения всхожести семян кормовых культур имеет высокую актуальность.

Биологический способ повышения всхожести семян, основанный на использовании микроорганизмов, отвечает всем этим требованиям. Для создания биоудобрения для повышения всхожести семян наиболее перспективно применять целлюлолитические бактерии. Эти бактерии синтезируют особые ферменты - целлюлазы, которые частично разрушают целлюлозу твердой оболочки семян, образуя в ней микротрещины, оболочка семян становится мягкой и зародыш легко прорастает через неё. Этот процесс заменяет процесс механической скарификации семян. На основе целлюлолитических бактерий возможно создание биоудобрения для донника и люцерны, которое будет экологически чистым, отвечающим требованиям охраны окружающей среды, не требующего специального оборудования и больших материальных и энергетических затрат. Для разработки такого удобрения необходимо выделить, отселектировать штаммы целлюлолитических бактерий, изучить их влияние на всхожесть семян и отобрать наиболее активные.

Целью данного исследования было изучение влияния штаммов целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны, отбор наиболее активных штаммов.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии, выделенные из почв и целлюлозосодержащих субстратов, собранных на полях Алматинской области Казахстана. В качестве целлюлозосодержащих растительных остатков использовали разложившиеся стебли, листья, корешки растений.

В опытах использовали два сорта донника - «Аркас» и «Желтый» и два сорта люцерны (*Medicago sativa* L.) - «Семиреченская» и «Семиреченская новая». Сорт «Аркас» относится к доннику белому (*Melilotus albus* Medik.) и характеризуется низким содержанием алкалоида кумарина, сорт «Желтый» относится к доннику желтому (*Melilotus officinalis* Pall.) и является отличным медоносом. Семена растений были предоставлены ТОО «Казахский НИИ земледелия и растениеводства» (отдел кормовых, масличных культур и кукурузы). Эти сорта рекомендованы для выращивания в юго-восточном регионе Казахстана и широко используются фермерами.

Целлюлолитические бактерии были выделены на селективной среде Гетчинсона. Для выделения бактерий 15 г почвы разводили в 90 мл дистиллированной стерильной воды и перемешивали на шейкере при 180 об/мин в течение 2 часов. Далее проводили серию разведений, перенося 1 мл полученной суспензии в пробирку, содержащую 9 мл стерильной воды и т.д. до разведения  $10^{-8}$ . Посев микроорганизмов проводили из разведений  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  в чашки Петри с агаризованной средой Гетчинсона, на поверхность которой помещали стерильную фильтровальную бумагу. Объем посевного материала составлял 1 мл почвенной суспензии. При выделении бактерий из целлюлозосодержащих субстратов на фильтровальную бумагу помещали кусочки субстратов величиной 1-2 мм [13]. Засеянные чашки Петри инкубировались в термостате при 28°C в течение 10 дней. Каждое разведение высевали в пятикратной повторности. Чашки Петри культивировали при температуре 30°C в течение 7 суток [14].

Культивирование целлюлолитических бактерий проводили на жидкой селективной среде Гетчинсона на шейкере при 180 об/мин и на твердых питательных средах (среда Гетчинсона, МПА) при температуре 30°C.

Лабораторные опыты по изучению влияния бактерий на всхожесть семян, рост и развитие растений донника и люцерны проводили в климатической камере роста (Constant Climate Chamber HPP-750, «Mettert», Germany). Параметры режима камеры роста: световой день - 12 ч, температура 25°C, освещенность: холодный белый свет - 6500 К, теплый свет 2700 К; ночной режим - 12 ч; температура 15°C, влажность - 65%. Для обработки семян использовали бактериальные суспензии с титром  $1 \times 10^8$  кл/мл из расчета 15 мл на 100 г семян. Время обработки семян при комнатной температуре составляло 2 часа. Контролем служили семена, замоченные в стерильной водопроводной воде. Далее семена высевали в сосуды на 250 мл с почвой. Количество семян составляло 7 растений на сосуд. Длительность опытов составляла 20 дней. Повторность опытов 3-кратная.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [15].

### Результаты и обсуждение

В лабораторных условиях проведено изучение влияния целлюлолитических бактерий на всхожесть семян и развитие растений донника и люцерны. В опытах использовали шесть штаммов бактерий (С-21(18)N, С-21N2, С-21(2)AS, С-22TN, С-182K, С-604N), которые характеризовались высокой активностью целлюлазного комплекса. Опыты проводили в сосудах с почвой. Семена люцерны и донника перед посевом обрабатывали суспензией бактерий в течение двух часов при комнатной температуре (раздел «Материалы и методы»). В контроле семена замачивали в стерильной

водопроводной воде. После этого семена высевали в сосуды с почвой и помещали в камеру роста.

Полученные данные по влиянию целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны представлены в таблице.

Таблица - Влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян, рост и развитие донника и люцерны

Варианты опыта	Всхожесть, %	Длина стебля, см	Длина корня, см	Кол-во листьев, шт.	Количество корней, шт.
Донник, сорт «Аркас»					
Контроль	20,3	1,88±0,1	1,07±0,03	2,33±0,1	1,0±0,04
C-21(18)N	57,1	4,58±0,2	3,73±0,2	2,88±0,1	2,75±0,1
C-21N2	63,4	5,41±0,3	3,58±0,2	2,79±0,2	1,86±0,1
C-182K	53,5	7,54±0,2	2,73±0,1	2,57±0,1	2,43±0,1
C-21(2)AS	56,8	2,93±0,1	2,25±0,1	2,91±0,1	1,2±0,02
C-22TN	60,6	4,38±0,2	2,59±0,1	2,33±0,1	1,22±0,1
C-604N	57,2	4,94±0,1	3,51±0,2	2,14±0,1	3,30±0,1
Донник, сорт «Желтый»					
Контроль	40,3	2,14±0,1	0,94±0,06	1,86±0,1	1,11±0,06
C-21(8)N	57,2	4,81±0,3	3,36±0,3	2,64±0,2	1,14±0,1
C-21N2	49,5	4,64±0,2	2,97±0,1	2,91±0,2	1,20±0,04
C-82K	63,8	5,11±0,3	2,71±0,2	2,86±0,2	2,36±0,2
C-21(2)AS	48,2	5,65±0,2	3,05±0,2	2,77±0,1	1,92±0,05
C-22TN	53,8	2,98±0,08	4,48±0,3	2,40±0,1	1,40±0,1
C-604N	57,3	6,84±0,2	3,15±0,1	3,11±0,2	3,18±0,2
Люцерна, сорт «Семиреченская новая»					
Контроль	61,3	2,01±0,1	1,05±0,06	2,06±0,1	1,2±0,06
C-21(18)N	85,2	4,71±0,2	3,48±0,2	2,42±0,1	1,26±0,04
C-21N2	89,3	4,02±0,3	2,40±0,1	2,39±0,2	1,86±0,1
C-182K	87,3	4,73±0,1	3,54±0,2	2,73±0,1	1,86±0,1
C-21(2)AS	85,5	6,07±0,3	5,48±0,3	2,73±0,2	2,5±0,1
C-22TN	86,8	3,90±0,2	3,08±0,2	2,56±0,1	2,92±0,2
C-604N	77,2	7,14±0,3	5,71±0,3	2,59±0,2	1,9±0,03
Люцерна, сорт «Семиреченская»					
Контроль	40,2	2,12±0,1	1,77±0,06	2,33±0,1	1,17±0,08
C-21(18)N	80,8	4,53±0,3	2,63±0,1	2,27±0,1	1,07±0,06
C-21N2	89,2	2,84±0,2	2,44±0,1	2,4±0,2	1,8±0,04
C-182K	87,3	3,87±0,2	2,97±0,2	2,25±0,1	1,9±0,05
C-21(2)AS	84,6	2,37±0,1	2,91±0,08	2,23±0,2	2,18±0,2
C-22TN	47,3	3,68±0,2	2,29±0,2	2,42±0,1	1,17±0,05
C-604N	79,6	4,19±0,2	2,57±0,2	2,16±0,1	1,68±0,04
Примечание - уровень доверительной вероятности $p < 0,05$					

Из данных, приведенных в таблице, следует, что штаммы целлюлолитических бактерий значительно повышают всхожесть семян донника и люцерны. Так, всхожесть обработанных семян донника возросла до 63,8%, в контрольных вариантах всхожесть донника сорта «Аркас» составляла только 20,3%, сорта «Желтый» - 40,3%. Обработка семян люцерны целлюлолитическими бактериями, повышала всхожесть до 89%, в контроле этот показатель у сорта люцерны «Семиреченская новая» составлял 61,3%, а у сорта «Семиреченская» - 40,2%.

Установлено, что обработка семян целлюлолитическими бактериями активно стимулировала развитие растений донника и люцерны. При этом, длина стебля донника



сорта «Аркас» увеличилась в 1,6-2,8 раза, длина корня - в 2,1-3,5 раза, длина стебля донника сорта «Желтый» - в 1,4-2,6, длина корня - в 3,2-4,8 по сравнению с контролем. Длина стеблей люцерны, обработанных бактериями, у сорта «Семиреченская новая» и «Семиреченская» увеличилась в 2,3-3,6 и 1,7-3,7 раза, длина корня у сорта «Семиреченская новая» и «Семиреченская» увеличилась в 3,1-5,4 и 1,3-1,6 раза по сравнению с контролем (рисунок).



слева - контроль; справа: 1 - обработка семян донника штаммом С-21(18)N; 2 - обработка семян люцерны штаммом С-21N2

Рисунок - Влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть семян донника и люцерны

По результатам исследований отобраны три штамма для донника: С-21(18)N, С-182К, С-22ТN и четыре штамма для люцерны: С-21N2, С-182К, С-21(2)AS, С-22ТN.

### Заклучение

Таким образом, изучено влияние целлюлолитических бактерий на всхожесть и развитие растений разных сортов донника и люцерны. Установлено, что предпосевная обработка семян штаммами целлюлолитических бактерий значительно повышает всхожесть донника и люцерны. Так, всхожесть семян донника возросла до 63,8%, люцерны - до 89%. Также выявлено, что обработка семян бактериями активно стимулирует рост и развитие растений этих культур. При этом, длина стебля донника увеличилась в 1,6-2,8 раза, длина корня - в 2,1-4,8 раза, длина стебля люцерны - в 1,7-3,7 раза, корня - в 3,1-5,4 раза. По результатам исследований отобраны наиболее активные штаммы бактерий: три штамма - для донника и четыре штамма - для люцерны.

Дальнейшее тестирование эффективности отобранных штаммов целлюлолитических бактерий в полевых условиях позволит отобрать перспективные штаммы, на основе которых будет создано биоудобрение для этих культур.



Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP08855656.

#### Литература:

- 1 Юрченко В.А. Путь создания прочной кормовой базы в Казахстане. - URL: <https://kazakh-zerno.net/112038-put-sozdaniya-prochnoj-kormovoj-bazy-v-kazakhstane/> (дата обращения 22.10.2021).
- 2 Пелевина А.И. Зернобобовые культуры - решение проблемы белка // Международный журнал социальных и гуманитарных наук. - 2017. - Т. 1(3). - С. 44-46.
- 3 Hua W., Luo P., An N., Cai F. et al. Manure application increased crop yields by promoting nitrogen use efficiency in the soils of 40-year soybean-maize rotation // *Scientific reports*. - 2020. - Vol. 10. - P. 14882. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71932-9>.
- 4 Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security // *Frontiers in Plant Science*. - 2018. - Vol. 9. - P. 1314.
- 5 Stagnari F., Maggio A., Galieni A., Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview // *Chemical and biological technologies in agriculture*. - 2017. - Vol. 4. - P. 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1/>.
- 6 Исакаков А. Продуктивность в животноводстве СКО ухудшается из-за снижения качества кормов. - URL: <https://zonakz.net/2018/04/10/produktivnost-v-zhivotnovodstve-sko-uxudshaetsya-iz-za-snizheniya-kachestva-kormov/> (дата обращения 19.10.2021).
- 7 Карашукеев Е. В Казахстане были нарушены основные принципы развития животноводства. - URL: [https://forbes.kz/news/2021/08/13/newsid\\_256479](https://forbes.kz/news/2021/08/13/newsid_256479) (дата обращения - 19.10.2021).
- 8 Игнатъев С.А., Регидин А.А., Грязева Т.В., Горюнов К.Н. Зерновое хозяйство России. - 2019. - № 6(66). - С. 46-49.
- 9 Kokonov S., Ryabova T., Votintsev A., Mokeeva S., Vorobyeva S., Esenkulova O. Influence of presowing seed treatment on the yield of variegated alfalfa and eastern galega // *Plant Science Today*. - 2021. - Vol. 8(2). - P. 250-254. doi:10.14719/pst.2021.8.2.1000.
- 10 Ахметзянова Р.Р., Каримов Х.З. Прием повышения семенной продуктивности, посевных качеств и урожайных свойств пестрогибридной люцерны // Вестник Омского государственного аграрного университета. - 2017. - № 1(25). - С. 5-10.
- 11 Волошин Е.И., Аветисян А.Т. Руководство по удобрению многолетних бобовых трав. - Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет, 2017. - 31 с.
- 12 Kimura E., Islam M.A. Seed scarification methods and their use in forage legumes // *Research Journal of Seed Science*. - 2012. - Vol. 5. - P. 38-50. DOI: [10.3923/rjss.2012.38.50](https://doi.org/10.3923/rjss.2012.38.50).
- 13 Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. - М. МГУ, 191. - 304 с.
- 14 Saha B., Roy S., Hossen F. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil sample and their antibiogram. *American Journal of Microbiological Research*. - 2019. - Vol. 7(3). - P. 83-90. DOI:10.12691/ajmr-7-3-3.
- 15 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. - М.: Stat Soft, 2013. - 268 с.

И.Э.СМИРНОВА, Э.Р. ФАЙЗУЛИНА, Л.Г. ТАТАРКИНА,  
Г.Б. БАЙМАХАНОВА, Г.А. СПАНКУЛОВА  
ЖШС «Микробиология и вирусология FӨO», Алматы, Қазақстан

## ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ТҰҚЫМДАРДЫҢ ӨСУІНЕ ЖӘНЕ ТҮЙЕЖОҢЫШҚА МЕН ЖОҢЫШҚА ӨСІМДІКТЕРІНІҢ ДАМУЫНА ӘСЕРІ.

### Түйін

Түйежоңышқа мен жоңышқаның әртүрлі сорттарының өнуіне және дамуына целлюлолитикалық бактериялардың әсері зерттелді. Тұқымдарды целлюлолитикалық бактериялармен өңдеу түйежоңышқа тұқымдарының өнгіштігін 63,8%-ға, жоңышқаныкіні 89%-ға

дейін арттырғаны анықталды. Сондай-ақ, тұқымдарды бактериялармен өңдеу бұл дақылдардың өсімдіктерінің өсуі мен дамуын ынталандыратыны көрсетілді. Сонымен бірге түйежоңышқаның сабақтары 1,6-2,8 ретке, тамыры - 2,1-4,8 ретке, жоңышқаның сабағының ұзындығы 1,7-3,7 ретке, тамыры 3,1-5,4 ретке өсті. Зерттеу нәтижелері бойынша ең белсенді штамм ретінде түйе жоңышқа үшін үш штамм және жоңышқа үшін төрт штамм таңдалды.

**Кілтті сөздер:** целлюлолитикалық бактериялар, түйежоңышқа, жоңышқа, тұқым, өну, өсуді ынталандыру.

IRSTI 34.27.17

I.E. SMIRNOVA, E.R. FAYZULINA, L.G. TATARKINA,  
G.B. BAIMAKHANOVA, G.A. SPANKULOVA

LLC «Scientific Production Center for Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan

## EFFECT OF CELLULOLYTIC BACTERIA ON SEED GERMINATION AND DEVELOPMENT OF SWEET CLOVER AND ALFALFA PLANTS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.01.08

### Abstract

The effect of cellulolytic bacteria on the germination and development of different varieties of sweet clover and alfalfa was studied. It was found that the treatment of seeds with cellulolytic bacteria increased the germination of seeds of sweet clover up to 63.8%, alfalfa up to 89% and stimulated the growth and development of plants of these crops. At the same time, the sweet clover of the stem length increased by 1.6-2.8 times, the root length - by 2.1-4.8 times, the alfalfa of the stem length by 1.7-3.7 times, the root by 3.1-5 times, 4 times. Based on the research results most active strains were selected: three strains for sweet clover and four for alfalfa as the

**Keywords:** cellulolytic bacteria, sweet clover, alfalfa, seeds, germination, growth stimulation

The traditional branch of the agro-industrial complex of Kazakhstan is animal husbandry. The main factor hindering the development of this industry is the lack of food supply [1]. In Kazakhstan, one of the main forage and legume crops are alfalfa and sweet clover, which are cultivated for grain and green mass. Sweet clover and alfalfa grass is characterized by a high protein content, which includes the main essential amino acids (lysine, valine, tryptophan, methionine, etc.). Their quantitative content in the protein of these crops is 1.5-3.0 times higher than in the protein of cereals [2]. Also, fodder legumes are able to actively fix atmospheric nitrogen and leave up to 40–100 kg/ha of nitrogen with crop residues in the soil, which is equivalent to 10–20 t/ha of manure [3]. In the future, these crops will take a leading place in biological farming to maintain soil fertility [4,5]. At the same time, the state of the forage base of Kazakhstan shows that the share of fodder and legumes in the crop rotation is only 15%, which is 2 times lower than the recommended one, and due to the low yield of crops, the existing crops are not enough for the development of animal husbandry in Kazakhstan [6,7].

One of the reasons for the low yield of fodder legumes is the poor germination of seeds, which is associated with the biological features of their structure. Some of the seeds of sweet clover and alfalfa have a shell that is impermeable to water and air, due to which the seeds cannot germinate immediately after sowing. This property is called seed hardness. Sweet clover and alfalfa contain up to 30–70% of such seeds [8]. When sown because of the hard shell, the seeds do not give friendly shoots, which creates a sparse crop and significantly reduces the yield of green mass of these crops per unit area [9].

To increase the germination of sweet clover and alfalfa seeds, scarification is most often used, in which the seeds are passed through special scarifying machines [10,11]. This method requires special equipment, high energy and labor costs. In addition, mechanical impact causes damage not only to the shell, but also to the seed embryo, which leads to its damage by

microbes, mold and decay, as a result of which a significant part of the seed material disappears [12]. Also, this method requires large material and energy costs, and special equipment. In this regard, the development of an affordable and effective way to increase the germination of seeds of fodder legumes is of high relevance.

The biological method of increasing the germination of seeds based on the use of microorganisms meets all these requirements. To create a biofertilizer to increase germination, it is most promising to use cellulolytic bacteria. These bacteria synthesize special enzymes - cellulases, which partially destroy the cellulose of the hard shell of seeds, forming microcracks in it, the shell of the seeds becomes soft and the embryo easily grows through it. This process replaces the process of mechanical seed scarification. On the basis of cellulolytic bacteria, it is possible to create a biofertilizer for sweet clover and alfalfa, which will be environmentally friendly, meet the requirements of environmental protection, which does not require special equipment and high material and energy costs. To develop such a fertilizer, it is necessary to isolate, select strains, study their effect on seed germination, and select the most active ones.

The goal of this study was to study the effect of cellulolytic bacteria strains on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa, and selection of the most active strains.

### Materials and methods

The objects of the study were cellulolytic bacteria isolated from soils and cellulose-containing substrates collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan. Decayed stems, leaves, and roots of plants were used as cellulose-containing plant residues.

Two varieties of sweet clover "Arkas" and "Yellow" and two varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) "Semirechenskaya" and "Semirechenskaya Novaya" were used in the experiments. Variety "Arkas" refers to white sweet clover (*Melilotus albus* Medik.) and is characterized by a low content of coumarin alkaloid, variety "Yellow" refers to yellow sweet clover (*Melilotus officinalis* Pall.) and is an excellent honey plant. Plant seeds were provided by LLP "Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant Growing" (department of fodder, oilseeds and corn). These varieties are recommended for cultivation in the south-eastern region of Kazakhstan and are widely used by farmers.

Cellulolytic bacteria were isolated on Hutchinson's elective medium. To isolate bacteria, 15 g of soil was diluted with 90 ml of distilled sterile water and mixed on a shaker at 180 rpm for 2 hours. Next, a series of dilutions was carried out, transferring 1 ml of the resulting suspension into a test tube containing 9 ml of sterile water, etc. up to a dilution of  $10^{-8}$ . Microorganisms were seeded from dilutions of  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$  in Petri dishes with agarized Hutchinson's medium, on the surface of which sterile filter paper was placed. The volume of inoculum was 1 ml of soil suspension. When bacteria were isolated from cellulose-containing substrates, pieces 1–2 mm in size were placed on filter paper [13]. Seeded cups were incubated in a thermostat at 28°C for 10 days. Each dilution was seeded in five replicates. The dishes were cultivated at 30°C for 7 days [14].

Cultivation of cellulolytic bacteria was carried out on liquid elective Hutchinson's medium on a shaker at 180 rpm and on solid nutrient media (Hutchinson's medium, MPA) at a temperature of 30°C. Laboratory experiments to study the effect of bacteria on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa plants were carried out in a climate growth chamber (Constant Climate Chamber HPP-750, Memmert, Germany). Growth chamber parameters: daylight - 12 hours, temperature 25°C, illumination: cold white light - 6500 K, warm light 2700 K; night mode - 12 hours; temperature 15°C, humidity - 65%. For seed treatment, bacterial suspensions were used with a titer of  $1 \times 10^8$  cells/ml at the rate of 15 ml per 100 g of seeds. The seed treatment time at room temperature was 2 hours. Seeds soaked in sterile tap water served as control. Next, the seeds were sown in 250 ml vessels with soil. The number of seeds was 7 plants per vessel. The duration of the experiments was 20 days. The repetition of experiments is 3-fold.

Statistical processing of the results was carried out using the STATISTICA 10.0 software package [15].

### Results and discussion

Under laboratory conditions, the influence of cellulolytic bacteria on the germination of seeds and the development of sweet clover and alfalfa plants was studied. Six strains of bacteria (C-21(18)N, C-21N2, C-21(2)AS, C-22TN, C-182K, C-604N) were used in the experiments, which were characterized by a high activity of the cellulase complex. Experiments were carried out in vessels with soil.

Seeds of alfalfa and sweet clover before sowing were treated with a suspension of bacteria for two hours at room temperature (section "Materials and Methods"). In the control, the seeds were soaked in sterile tap water. After that, the seeds were sown in pots with soil and placed in a growth chamber.

The obtained data on the effect of cellulolytic bacteria on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa are presented in the table.

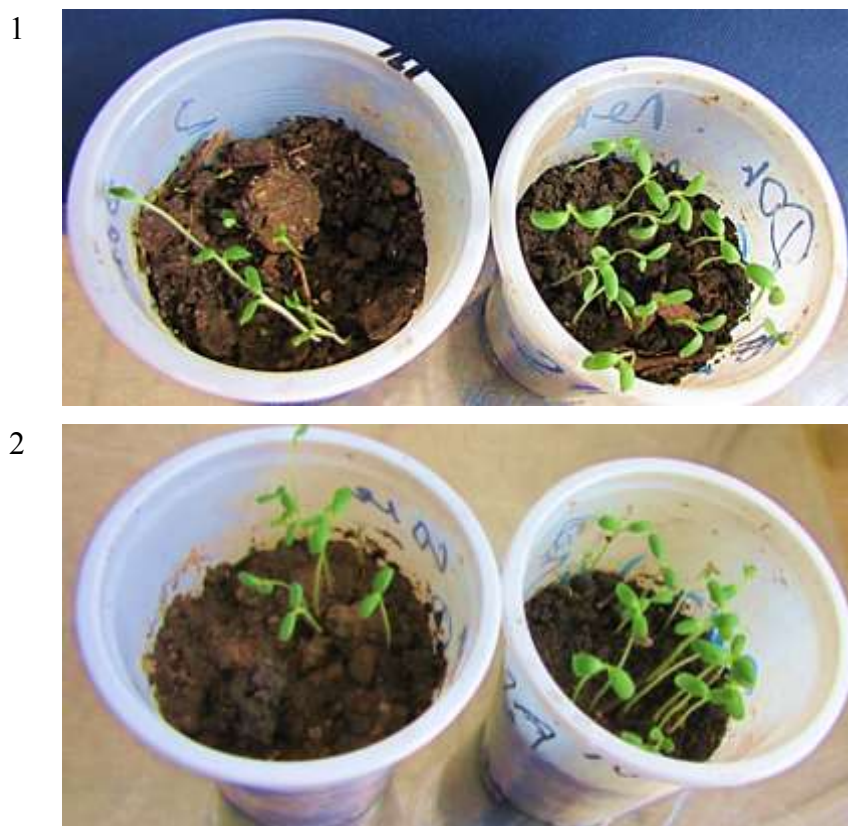
Table - Influence on cellulolytic bacteria on seed germination, growth and development of sweet clover and alfalfa

Variants	Germination, %	Stem length, cm	Root length, cm	Number of leaves, pcs.	Number of leaves, pcs..
Sweet clover variety "Arcas"					
Контроль	20,3	1,88±0,1	1,07±0,03	2,33±0,1	1,0±0,04
C-21(18)N	57,1	4,58±0,2	3,73±0,2	2,88±0,1	2,75±0,1
C-21N2	63,4	5,41±0,3	3,58±0,2	2,79±0,2	1,86±0,1
C-182K	53,5	7,54±0,2	2,73±0,1	2,57±0,1	2,43±0,1
C-21(2)AS	56,8	2,93±0,1	2,25±0,1	2,91±0,1	1,2±0,02
C-22TN	60,6	4,38±0,2	2,59±0,1	2,33±0,1	1,22±0,1
C-604N	57,2	4,94±0,1	3,51±0,2	2,14±0,1	3,30±0,1
Sweet clover variety "Yellow"					
Контроль	40,3	2,14±0,1	0,94±0,06	1,86±0,1	1,11±0,06
C-21(8)N	57,2	4,81±0,3	3,36±0,3	2,64±0,2	1,14±0,1
C-21N2	49,5	4,64±0,2	2,97±0,1	2,91±0,2	1,20±0,04
C-82K	63,8	5,11±0,3	2,71±0,2	2,86±0,2	2,36±0,2
C-21(2)AS	48,2	5,65±0,2	3,05±0,2	2,77±0,1	1,92±0,05
C-22TN	53,8	2,98±0,08	4,48±0,3	2,40±0,1	1,40 ±0,1
C-604N	57,3	6,84±0,2	3,15±0,1	3,11±0,2	3,18±0,2
Alfalfa variety "Semirechenskaya new"					
Контроль	61,3	2,01±0,1	1,05±0,06	2,06±0,1	1,2±0,06
C-21(18)N	85,2	4,71±0,2	3,48±0,2	2,42±0,1	1,26±0,04
C-21N2	89,3	4,02±0,3	2,40±0,1	2,39±0,2	1,86±0,1
C-182K	87,3	4,73±0,1	3,54±0,2	2,73±0,1	1,86±0,1
C-21(2)AS	85,5	6,07±0,3	5,48±0,3	2,73±0,2	2,5±0,1
C-22TN	86,8	3,90±0,2	3,08±0,2	2,56±0,1	2,92±0,2
C-604N	77,2	7,14±0,3	5,71±0,3	2,59±0,2	1,9±0,03
Alfalfa variety "Semirechenskaya"»					
Контроль	40,2	2,12±0,1	1,77±0,06	2,33±0,1	1,17±0,08
C-21(18)N	80,8	4,53±0,3	2,63±0,1	2,27±0,1	1,07±0,06
C-21N2	89,2	2,84±0,2	2,44±0,1	2,4±0,2	1,8±0,04
C-182K	87,3	3,87±0,2	2,97±0,2	2,25±0,1	1,9±0,05
C-21(2)AS	84,6	2,37±0,1	2,91±0,08	2,23±0,2	2,18±0,2
C-22TN	47,3	3,68±0,2	2,29±0,2	2,42±0,1	1,17±0,05
C-604N	79,6	4,19±0,2	2,57±0,2	2,16±0,1	1,68±0,04

Note - confidence level  $p < 0.05$

From the data given in the table, it follows that cellulolytic bacteria strains significantly increased the germination of sweet clover and alfalfa seeds. Thus, the germination of treated seeds of sweet clover increased to 63.8%, in the control variants the germination of sweet clover of the variety «Arkas» was only 20.3%, of the sweet clover variety «Yellow» - 40.3%. The treatment of alfalfa seeds with cellulolytic bacteria increased the germination rate to 89%, in the control this indicator for the alfalfa variety "Semirechenskaya New" was 61.3%, and for the variety "Semirechenskaya" - 40.2%.

It was established that seed treatment with bacteria actively stimulated the development of sweet clover and alfalfa plants. At the same time, the length of the stem of the sweet clover variety "Arkas" increased by 1.6-2.8 times, the length of the root - by 2.1-3.5 times, the length of the stem of the sweet clover variety "Yellow" - by 1.4-2.6, root length - 3.2-4.8 compared with the control. The length of alfalfa stalks treated with bacteria increased by 2.3-3.6 and 1.7-3.7 times in the varieties «Semirechenskaya New» and «Semirechenskaya», the length of the root in the varieties «Semirechenskaya New» and «Semirechenskaya» increased by 3.1-5.4 and 1.3-1.6 times compared with the control (figure).



Left - control; right: 1 - seed treatment of sweet clover strain C-21(18)N; 2 - treatment of alfalfa seeds with strain C-21N2

Figure - Influence of cellulolytic bacteria on the germination of sweet clover and alfalfa seeds

### Conclusion

Thus, the effect of cellulolytic bacteria on the germination and development of plants of different varieties of sweet clover and alfalfa was studied. It was established that presowing treatment of seeds with strains of cellulolytic bacteria significantly increased the germination of sweet clover and alfalfa. Thus, the germination of sweet clover seeds increased to 63.8%, alfalfa - up to 89%. It was also found that seed treatment with bacteria actively stimulated the growth and development of sweet clover and alfalfa plants. At the same time, the sweet clover stem length increased by 1.6-2.8 times, the root length - by 2.1-4.8 times, the alfalfa stem length by

1.7-3.7 times, the root length by 3.1-5.4 times depending on the bacterial strain. According to the results of the research, the most active strains of bacteria were selected, for sweet clover - three strains, for alfalfa - four strains.

Further testing of the efficiency of the selected strains of cellulolytic bacteria in the field will allow the selection of promising strains, on the basis of which a biofertilizer for these crops will be created.

The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the grant project AP08855656.

### References:

- 1 Jurchenko V.A. Put' sozdaniya prochnoj kormovoj bazy v Kazahstane. URL: <https://kazakh-zerno.net/112038-put-sozdaniya-prochnoj-kormovoj-bazy-v-kazahstane/> (data obrashhenija 22.10.2021).
- 2 Pelevina A.I. Zernobobovye kul'tury - reshenie problemy belka. Mezhdunarodnyj zhurnal social'nyh i gumanitarnyh nauk. 2017. T. 1(3). S. 44-46.
- 3 Hua W., Luo P., An N., Cai F. Manure application increased crop yields by promoting nitrogen use efficiency in the soils of 40-year soybean-maize rotation. Scientific reports. 2020. Vol. 10. P. 14882. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71932-9>.
- 4 Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. P. 1314.
- 5 Stagnari F., Maggio A., Galieni A. Pisante M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. Chemical and biological technologies in agriculture. 2017. Vol. 4. P. 2. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0085-1/>.
- 6 Iskakov A. Produktivnost' v zhitovnovodstve SKO uhdshaetsja iz-za snizhenija kachestva kormov. URL: <https://zonakz.net/2018/04/10/produktivnost-v-zhitovnovodstve-sko-uxudshaetsya-iz-za-snizheniya-kachestva-kormov/> (data obrashhenija 19.10.2021).
- 7 Karashukeev E. V Kazahstane byli narusheny osnovnye principy razvitija zhitovnovodstva. URL: [https://forbes.kz/news/2021/08/13/newsid\\_256479](https://forbes.kz/news/2021/08/13/newsid_256479) (data obrashhenija -19.10.2021).
- 8 Ignat'ev S.A., Regidin A.A., Grjazeva T.V., Gorjunov K.N. Zernovoe hozjajstvo Rossii. 2019. № 6(66). S. 46-49.
- 9 Kokonov S., Ryabova T., Votintsev A., Mokeeva S., Vorobyeva S., Esenkulova O. Influence of presowing seed treatment on the yield of variegated alfalfa and eastern galega. Plant Science Today. 2021. Vol. 8(2). P. 250-254. doi:10.14719/pst.2021.8.2.1000.
- 10 Ahmetzjanova R.R., Karimov H.Z. Priem povyshenija semennoj produktivnosti, posevnyh kachestv i urozhajnyh svojstv pestrogibridnoj ljucerny. Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2017. № 1(25). S. 5-10.
- 11 Voloshin E.I., Avetisjan A.T. Rukovodstvo po udobreniju mnogoletnih bobovyh trav. - Krasnojarsk: Krasnojarskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, 2017. 31 s.
- 12 Kimura E., Islam M.A. Seed scarification methods and their use in forage legumes // Research Journal of Seed Science. 2012. Vol. 5. P. 38-50. DOI: 10.3923/rjss.2012.38.50.
- 13 Zvjagincev D.G. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. M. MGU, 191. 304 s.
- 14 Saha B., Roy S., Hossen F. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from soil sample and their antibiogram. American Journal of Microbiological Research. 2019. Vol. 7(3). R. 83-90. DOI:10.12691/ajmr-7-3-3.
- 15 Borovikov V.P. Populjarnoe vvedenie v sovremennyj analiz dannyh v sisteme STATISTICA. M.: Stat Soft, 2013. 268 s.

**ПРАВИЛА**  
издания журнала  
**«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖЭНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»**

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Плата за публикацию статей не взимается.

Представленные для опубликования материалы должны удовлетворять следующим требованиям:

Содержать результаты оригинальных научных исследований по актуальным проблемам в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии, ранее не опубликованные и не предназначенные к публикации в других изданиях.

Все статьи принимаются и публикуются одновременно на двух языках (казахском и английском, или русском и английском).

Статьи принимаются в электронном виде через профиль автора на сайте [imv-journal.kz](http://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.
- Отсканированное экспертное заключение о возможности публикации материалов в открытой печати.

**2. Статья должна содержать:**

- МРНТИ – межгосударственный рубрикатор научно-технической информации



- Фамилии авторов статьи (прописными буквами, инициалы следуют перед фамилией);
- Название организации, в которой была выполнена работа и город (строчными буквами);
- Название статьи (прописными буквами полужирным шрифтом);
- Аннотация (в начале статьи перед основным текстом);
- Ключевые слова (не более 7);
- Введение (без заголовка), в котором кратко излагается актуальность и новизна рассматриваемого вопроса;
- Основной текст (включает материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, содержащее краткое изложение основных результатов работы);
- Список литературы (оформляется с указанием фамилии и инициалов автора, полного названия книги (статьи), места издания, названия журнала (года, тома, номера, страницы).

**3. Размер одной статьи** не должен превышать 5-7 машинописных страниц (статьи обзорного характера – до 15 стр.), включая аннотацию, таблицы, рисунки, список литературы. В том же файле следует представлять резюме на трех языках (казахском, русском и английском).

**4. Статья должна быть** набрана на компьютере в редакторе Word 2003, шрифтом Times New Roman 12 пт, с пробелом между строк 1 компьютерный интервал, поля – верхнее и нижнее 2 см, левое 3 см, правое 1,5 см. Количество рисунков – не более пяти. Аннотация, таблицы, рисунки, список литературы – 11 пт через 1 компьютерный интервал. Ссылки на литературные источники даются цифрами в прямых скобках по мере упоминания и должны быть идентичными на двух языках. Необходимо тщательно следить за точным соответствием обозначений в тексте и на таблицах, рисунках и др. При изложении экспериментального материала должна быть использована международная система единиц (СИ).

**5. После статьи на английском языке** приводится список литературы в романском алфавите (References) для SCOPUS и других БАЗ ДАННЫХ полностью отдельным блоком, повторяя список литературы к русскоязычной части, независимо от того, имеются или нет в нем иностранные источники. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите (латиница).

В References не используются разделительные знаки («//» и «←»). Название источника и выходные данные отделяются от авторов типом шрифта, чаще всего курсивом, точкой или запятой.

На сайте <http://www.translit.ru/> можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу, используя различные системы. Программа очень простая, ее легко использовать для готовых ссылок. К примеру, выбрав вариант системы Библиотеки Конгресса США (LC), получаем изображение всех буквенных соответствий. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

**6. Статьи, не соответствующие Правилам, не публикуются и не возвращаются автору.** Редакция оставляет за собой право производить сокращения и правки статей.





ISSN 2304-585X



9 772304 585132