



ISSN 2304-585X

ИНДЕКС 76057

2022

Microbiology and virology МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ



ВИРУСОЛОГИЯ

№2(37)

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

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

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

№ 2(37)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ
2022

ISSN 2304–585 X
МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ
№ 2(37)/2022

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

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ

© ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

Редакционная коллегия

Саданов А.К. – доктор биологических наук, профессор, академик (главный редактор)
 Айткельдиева С.А. – доктор биологических наук (заместитель главного редактора)
 Балгимбаева А.С. – кандидат биологических наук (ответственный секретарь)
 Dr.Azliati Azizan (USA) – PhD
 Березин В.Э. – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент НАН РК
 Богоявленский А.П. – доктор биологических наук, профессор
 Гаврилова Н.Н. – доктор биологических наук, профессор
 Головлева Л.А. (Россия) – доктор биологических наук, профессор
 Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук
 Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук
 Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана
 Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор
 Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент
 Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор
 Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD
 Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор
 Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

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

Сайт: <http://imv-journal.kz>

Подписной индекс - 76057

ПЕЧАТЬ

ТОО «Print Market.kz»

Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125

Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68

Территория распространения –

Республика Казахстан

Периодичность – 4 номера в год

Тираж 500 экземпляров

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Ж.Б. Сулейменова, О.Н. Шемшура, Г.А. Момбекова, Ж.Н. Шемшеева

Влияние ультрафиолетового облучения на ростостимулирующую активность PGPR-бактерий, способствующих росту растений.....4

Н.Н. Гаврилова, А.К. Саданов, И.А. Ратникова, Е.Ж. Шорабаев, С.Э. Оразымбет, Г.К. Таубекова, Р.Ж. Каптагай, Л.А. Кошелева, У.Ж. Керембекова, Ж.Т. Мусабеков, С.Б. Джайлауова

Оптимизация пробиотической кормовой добавки «БЕНТОБАК» для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных.....14

И.Э. Смирнова, Ш.А. Бабаева, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова

Выделение клубеньковых бактерий, перспективных для выращивания культуры сои.....32

А.И. Кыдырманов, К.О. Карамендин, Е.Т. Касымбеков, С.А. Сулейменова, С. Гудман

Герпесвирусы каспийских тюленей (*Pusa caspica*).....41

Н.Н. Гаврилова, А.К. Саданов, И.А. Ратникова, Е.Ж. Шорабаев, С.Э. Оразымбет, Г.К. Таубекова, Р.Ж. Каптагай, Л.А. Кошелева, У.Ж. Керембекова, Ж.Т. Мусабеков, С.Б. Джайлауова

Создание биопрепарата «КАЗБИОСИЛ» в жидком и сухом виде.....48

И.Э. Смирнова, Ш.А. Бабаева, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова

Подбор источников углеродного питания для культивирования целлюлолитических бактерий.....69

О.Н. Шемшура, А.И. Байдалинов, Ж.Б. Сулейменова, Г.Т. Джакибаева, Г.Б. Баймаханова, Г.А. Момбекова

Штамм *Chryseobacterium Rhizoplanae* IM – основа биопрепарата против фузариозной гнили *Vigna Radiata* и оценка его биобезопасности.....80

МАЗМҰНЫ

CONTENTS

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

Ж.Б. Сулейменова, О.Н. Шемшұра, Г.А. Момбекова, Ж.Н. Шемшеева
Өсімдіктің өсіруін жүргізетін PGPR бактерияларының өсіруін арқыландыру әрекетіне ультракүлгін сәулеленудің әсері.....9

ZH.B. Suleimenova, O.N. Shemshura, G.A. Mombekova, ZH.N. Shemsheeva
Effect of ultraviolet irradiation on the growth-stimulating activity of PGPR bacteria that promotes plant growth.....9

Н.Н. Гаврилова, А.К. Саданов, И.А. Ратникова, Е.Ж. Шорабаев, С.Э. Оразымбет, Г.К. Таубекова, Р.Ж. Каптагай, Л.А. Кошелева, У.Ж. Керембекова, Ж.Т. Мусабеков, С.Б. Джайлауова
Ауыл шаруашылығы малдарының өнімділігін арттыру үшін "БЕНТОБАК" пробиотикалық жемшөп қоспасын оптимизациялау.....23

N.N. Gavrilova, A.K. Sadanov, I.A. Ratnikova, E.J. Shorabaev, S.E. Orazymbet, G.K. Taubekova, R.J. Kaptagai, L.A. Kosheleva, U.Zh. Kerembekova, J.T. Musabekov, S.B. Jailauova
Optimization of probiotic feed additive "BENTOBAC" for increasing productivity of farm animals.....24

И.Э. Смирнова, Ш.А. Бабаева, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова
Соя дақылдарын перспективті өсіру үшін түйнек бактерияларды бөліп алу.....36

I.E. Smirnova, Sh.A. Babaeva, E.R. Fayzulina, L.G. Tatarkina, G.A. Spankulova
Isolation of rhizobia, promising for soybean productivity.....37

А.И. Қыдырманов, Қ.О. Карамендин, Е.Т. Қасымбеков, С.А. Сүлейменова, С.Гудман
Каспий итбалықтарының герпес вирустары (Pusa caspica).....44

A.I. Kydyrmanov, K.O. Karamendin, E.T. Kasymbekov, S.A. Suleymenova, S. Goodman
Herpesviruses of the caspian seals (PUSA CASPICA).....45

Н.Н. Гаврилова, А.К. Саданов, И.А. Ратникова, Е.Ж. Шорабаев, С.Э. Оразымбет, Г.К. Таубекова, Р.Ж. Каптагай, Л.А. Кошелева, У.Ж. Керембекова, Ж.Т. Мусабеков, С.Б. Джайлауова
Сұйық және құрғақ түрінде "КАЗБИОСИЛ" препаратын жасау.....58

N.N. Gavrilova, A.K. Sadanov, I.A. Ratnikova, E.J. Shorabaev, S.E. Orazymbet, G.K. Taubekova, R.J. Kaptagai, L.A. Kosheleva, U.Zh. Kerembekova, J.T. Musabekov, S.B. Jailauova
Creation of kazbiosil biopreparation in liquid and dry form.....59

И.Э. Смирнова, Ш.А. Бабаева, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова
Целлюлолитикалық бактерияларды өсіру үшін көміртекті азық көзін таңдау.....74

I.E. Smirnova, Sh.A. Babaeva, E.R. Fayzulina, L.G. Tatarkina, G.A. Spankulov
Selection of carbon feed sources for cultivation of cellulolytic bacteria.....75

О.Н. Шемшұра, А.И. Байдалинов, Ж.Б. Сулейменова, Г.Т. Джакибаева, Г.Б. Баймаханова, Г.А. Момбекова
vigna radiata-ң ФУЗАРИОЗДЫ шірігіне қарсы биопрепарат негізі - *chryseobacterium rhizoplanae* 1M штаммы және оның биоқауіпсіздігінің бағасыюю.....86

O.N. Shemshura, A.I. Baidalinov, ZH.B. Suleimenova, G.T. Dzhakibaeva, G.B. Baimakhanova, G.A. Mombekova, ZH. N. Shemsheeva, E.T. Ismailova
The strain *chryseobacterium rhizoplanae* 1M - A basis of a biological preparation against fusarium rot *vigna radiata* and its biosafety assessment.....86

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 62.09.39

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА*, О.Н. ШЕМШУРА, Г.А. МОМБЕКОВА, Ж.Н. ШЕМШЕЕВА
ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы,
Казахстан
*e-mail: gnj40@inbox.ru

**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА
РОСТОСТИМУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ PGPR- БАКТЕРИЙ,
СПОСОБСТВУЮЩИХ РОСТУ РАСТЕНИЙ**

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.01

Аннотация

В статье приведены результаты исследования влияния мутантных штаммов ризобактерий, способствующих росту растений (PGPR- бактерий), подвергшихся ультрафиолетовому облучению, на всхожесть и энергию прорастания семян маша сорта «Победа-54» и фасоли сорта «Инжу - 077». В качестве объектов исследования использовались *Pseudomonas putida* 4/1, *Azotobacter chroococcum* P29 и *Bacillus subtilis*. В результате проведения УФ-облучения трех коллекционных штаммов PGPR-бактерий установлено, что 1%-ное выживание моноизолятов достигается при облучении УФ-лучами в течение 60 минут.

Обработка семян маша полученными мутантными штаммами оказала положительное влияние на всхожесть семян по сравнению с обработкой семян исходными вариантами ризобактерий и контролем. Однако увеличение ростостимулирующей активности по сравнению с исходными штаммами отмечено только у мутантного штамма *Pseudomonas putida* M-1. Длина стебля и корней при этом увеличилась в среднем в 1,2 раза (стебель) и в 1,08 раза (корень) по сравнению с этими показателями растений, семена которых были обработаны исходным штаммом, а по сравнению с контролем - в 2,9 и 2,6 раза, соответственно.

Обработка же семян фасоли мутантными штаммами исследуемых бактерий не оказала положительного влияния ни на всхожесть семян, ни на прирост корня и стебля по сравнению с исходными вариантами и контролем.

Ключевые слова: PGPR-бактерии, УФ-облучение, мутагенез, маш, фасоль

В мире постоянно растёт спрос на экологически чистую продукцию, и потребность сельского хозяйства в безопасных биологических препаратах увеличивается с каждым годом. В последнее время всё большее внимание ученых приковано к созданию биопрепаратов, основу которых составляют ризобактерии, стимулирующие рост растений – PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Использование в практике сельского хозяйства биологических препаратов, созданных на основе PGPR-бактерий, является одним из технологических приемов, способствующих повышению урожайности с/х культур [1, 2].

PGPR-бактерии положительно действуют на растения, а именно, обладают способностью фиксировать молекулярный азот атмосферы, синтезировать вещества гормональной природы (ауксины, гибберелины, цитокинины), витамины, вещества антибиотической и антифунгальной природы, а также способностью к разложению вредных химических соединений. Использование PGPR-бактерий способствует

стимуляции прорастания семян и роста растений, улучшению азотного питания растений, образованию клубеньков у бобовых, подавляет развитие корневых гнилей растений и т.д. [3, 4].

В настоящее время источником многих генетических вариаций микроорганизмов является мутагенез, который позволяет повысить производительность штаммов-продуцентов и снизить затраты на их культивирование. Для получения высокоактивных штаммов ризобактерий используют методы физического и химического мутагенеза, которые являются эффективным инструментом в повышении активности исследуемых культур и широко используются в биотехнологии [5, 6]. Известно, что индуцированные мутации - наследуемые изменения генома, возникающие в результате тех или иных мутагенных воздействий в искусственных (экспериментальных) условиях или при неблагоприятных воздействиях окружающей среды. Индуцирование мутации осуществляются с использованием мутагенных факторов физической и химической природы. Высокая мутабельность бактерий связана с особенностями организации генома, а также с высокой их скоростью размножения и роста. Поглощение света нуклеиновыми кислотами лежит в основе мутагенного и бактерицидного действия УФ-излучения. При этом повреждения возникают не только в молекуле ДНК, но и инактивируются ферменты репарации, что и приводит к возникновению мутаций [7, 8].

Известно, что индуцированный мутагенез является эффективным инструментом для достижения генетических и функциональных изменений организма. Так например, штаммы *Rhizobium*, выделенные из арахиса и пажитника, были подвержены УФ-мутагенезу, после чего полученные мутантные штаммы были обработаны мутагенами химической природы (EtBr, Acrylamide и Tetra Methyl Ethylene Diamine - TEMED). Далее было изучено влияние полученных мутантных штаммов на всхожесть и энергию прорастания семян арахиса и маша. Было установлено, что при обработке мутантными штаммами семян арахиса наблюдалась 50%-ная всхожесть, тогда как при обработке мутантными штаммами семян маша всхожесть была значительно выше – около 70–80% [8]. Таким образом, индуцированный мутагенез является удобным инструментом для достижения генетических и функциональных изменений организма.

Целью данного исследования было изучить влияние ультрафиолетового излучения на ростостимулирующую активность PGPR-бактерий.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований служили бактерии из коллекции ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии»: *Pseudomonas putida* 4/1, *Azotobacter chroococcum* P29 и *Bacillus subtilis*. В качестве опытных растений использованы семена фасоли сорта «Инжу - 077» и маша сорта «Победа-54». В работе использовались общепринятые микробиологические и биохимические методы исследований [9-11]. Исходные культуры выращивали на следующих питательных средах: кинг Б (*Pseudomonas putida* 4/1), гороховая среда (*Azotobacter chroococcum* P29) и мясо-пептонный агар (*Bacillus subtilis*) при температуре 30°C.

В качестве источника УФ-излучения использована ртутно-кварцевая лампа, которая обеспечивала диапазон длин волн ультрафиолетового облучения $\lambda = 240\text{--}578$ нм. УФ-мутагенез проводили по методу, описанному Kamala Kumari et al. [12]. В качестве мутагена применяли ультрафиолетовые лучи длиной волны 260 нм, при которой наблюдается максимум поглощения УФ-света молекулами ДНК. Единичные колонии PGPR-бактерий суспендировали в 3 мл жидкой питательной среды. После этого 0,5 мл каждого образца добавляли к 50 мл жидкой питательной среды и культивировали при температуре 30°C (200 об/мин) до тех пор, пока оптическая плотность не достигала 600 ед. Через 6 часов инкубации полученная культуральная жидкость должна соответствовать культуре

средней фазы. После этого отбирали 20 мл культуральной жидкости и центрифугировали в течение 10 минут при 1700 об/мин. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (рН - 7,0), после чего 15 мл суспензии подвергалось воздействию УФ-лучей. Облучение проводили в режимах 30-, 45- и 60-минутной экспозиции. Далее использовали серийные разведения для вычисления процента летальности.

Полученные данные обрабатывали методом вариационно-статистического анализа, принимая критерием вероятности $P < 0.05$ [13].

Результаты и обсуждение

Простым и удобным методом получения мутантов разного типа является УФ-облучение. Однако высокая частота мутаций достигается здесь при низкой выживаемости клеток. В ходе проведения эксперимента применяли ультрафиолетовые лучи длиной волны 260 нм, при которой наблюдается максимум поглощения УФ-лучей молекулами ДНК. В ходе исследований установлено, что облучение ультрафиолетом вызывает уменьшение жизнеспособности клеток бактерий (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние ультрафиолетового облучения на колониеобразующую способность PGPR- бактерий

PGPR- бактерии	Время облучения, мин	Титр клеток до облучения, КОЕ/мл	Титр клеток после облучения, КОЕ/мл
<i>Pseudomonas putida</i> 4/1	30	$(8,8 \pm 3,28) \times 10^8$	$(6,5 \pm 2,11) \times 10^8$
	45		$(5,8 \pm 1,24) \times 10^7$
	60		$(9,0 \pm 1,26) \times 10^6$
<i>Azotobacter chroococcum</i> P29	30	$(9,7 \pm 3,21) \times 10^8$	$(5,3 \pm 3,21) \times 10^8$
	45		$(3,7 \pm 2,45) \times 10^7$
	60		$(9,1 \pm 2,28) \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	30	$(8,5 \pm 2,18) \times 10^8$	$(6,8 \pm 3,08) \times 10^8$
	45		$(3,0 \pm 2,27) \times 10^7$
	60		$(8,3 \pm 2,16) \times 10^6$

Как видно из представленных в таблице 1 данных, при УФ-облучении в течение 60 минут наблюдался 1% выживания моноизолятов. Титр клеток составил для *Pseudomonas putida* 4/1 $9,0 \pm 1,26 \times 10^6$ КОЕ/мл, для *Azotobacter chroococcum* P29 - $9,1 \pm 2,28 \times 10^6$ КОЕ/мл, для *Bacillus subtilis* - $8,3 \pm 2,16 \times 10^6$ КОЕ/мл.

После этого изучали влияние полученных мутантных штаммов PGPR-бактерий на всхожесть и энергию прорастания семян маша сорта «Победа-54» и фасоли сорта «Инжу - 077». Энергия прорастания – это выраженное в процентах соотношение числа проросших семян к общему их количеству на определенный, условно принятый день проращивания. Этот показатель широко используется не только при определении качества семян (так как при низкой энергии прорастания всхожесть семян снижена), но и при изучении тех или иных воздействий на семена. Под всхожестью (жизнеспособностью) понимается способность семян давать нормальные проростки за определенный для каждого вида растений срок при оптимальных условиях проращивания. Процент всхожести – это отношение числа нормальных проросших семян к их количеству, взятому для проращивания.

Энергию прорастания определяли на 4-й день после обработки семян маша и фасоли культуральной жидкостью, тогда как всхожесть семян маша определяли на 7-е сутки, а семян фасоли - на 5-й день. Полученные данные приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Влияние PGPR-бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян фасоли до и после УФ- облучения

Наименование штамма		Количество семян, 100 шт.		Длина, см	
		энергия прорастания, % (4 сут.)	всхожесть, % (5 сут.)	корень	стебель
Исходные штаммы	<i>Pseudomonas putida</i> 4/1	75	81	6,3±0,2	20,0±0,3
	<i>Azotobacter chroococcum</i> P29	75	90	6,2±0,1	18,7±0,3
	<i>Bacillus subtilis</i>	81	90	7,2±0,2	21,3±0,2
Мутантные штаммы	<i>Pseudomonas putida</i> M-1	75	85	5,1±0,2	16,5±0,3
	<i>Azotobacter chroococcum</i> M-1	79	85	4,5±0,1	13,0±0,3
	<i>Bacillus subtilis</i> M-1	72	80	6,5±0,4	13,2±0,2
Контроль (вода)		62	70	5,8±0,2	18,7±0,2

Как видно из представленных в таблице 2 данных, обработка семян фасоли мутантными штаммами *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacter chroococcum* M-1 и *Bacillus subtilis* M-1 не оказала положительного влияния на энергию прорастания и всхожесть семян, а также на прирост корня и стебля по сравнению с обработкой семян исходными вариантами ризобактерий и контролем.

Таблица 3 – Влияние PGPR-бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян маша до и после УФ- облучения

Наименование штамма		Количество семян, (100 шт.)		Длина, см	
		энергия прорастания, % (4 сут.)	всхожесть, % (7 сут.)	корень	стебель
Исходные штаммы	<i>Pseudomonas putida</i> 4/1	75	90	10,0±0,2	8,8±0,3
	<i>Azotobacter chroococcum</i> P29	75	100	5,1±0,3	8,9±0,2
	<i>Bacillus subtilis</i>	81,5	100	4,9±0,3	17,3±0,1
Мутантные штаммы	<i>Pseudomonas putida</i> M-1	75	95	10,8±0,1	10,6±0,2
	<i>Azotobacter chroococcum</i> M-1	79	100	4,0±0,3	8,2±0,3
	<i>Bacillus subtilis</i> M-1	72	95	4,8±0,2	11,1±0,1
Контроль (вода)		62	80	4,1±0,3	3,6±0,2

Как видно из представленных в таблице 3 данных, обработка семян маша сорта «Победа-54» мутантными штаммами *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacter chroococcum* M-1 и *Bacillus subtilis* M-1 оказала положительное влияние на всхожесть семян по сравнению с обработкой семян исходными вариантами ризобактерий и контролем. При этом увеличение ростостимулирующей активности по сравнению с исходными штаммами отмечено только у мутантного штамма *Pseudomonas putida* M-1. Длина стебля и корней в среднем увеличилась в этом случае по сравнению с исходным штаммом в 1,2

раза (стебель) и в 1,08 раза (корень), а по сравнению с контролем - в 2,9 и 2,6 раза, соответственно.

Таким образом, в результате проведения УФ-облучения трех коллекционных штаммов PGPR- бактерий установлено, что 1% выживания моноизолятов достигается при облучении УФ-лучами в течение 60 минут. Обработка семян маша полученными мутантными штаммами *Pseudomonas putid M-1*, *Azotobacter chroococcum M-1* и *Bacillus subtilis M-1* оказала положительное влияние на всхожесть семян маша по сравнению с обработкой семян исходными вариантами ризобактерий и контролем. При этом увеличение ростостимулирующей активности по сравнению с исходными штаммами отмечено только у мутантного штамма *Pseudomonas putida M-1*. Обработка же семян фасоли мутантными штаммами исследуемых бактерий не оказала положительного влияния ни на всхожесть семян, ни на прирост корня и стебля по сравнению с обработкой семян исходными вариантами ризобактерий и контролем.

Литература:

- 1 Tchakounté G.V.T., Berger B., Patz S., Fankem H., Ruppel S. Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil // Microbiological Research. – 2018. – Vol. 214. P. 47-59.
- 2 Song X., Liu M., Wu D, Griffiths B.S., Jiao J., Li H., Hu F. Interaction matters: Synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field // Applied Soil Ecology. – 2015. – Vol. 89. – P. 25-34.
- 3 Arif M.S., Riaz M., Shahzad S.M., Buttler A. Associative interplay of plant growth promoting rhizobacteria (*Pseudomonas aeruginosa* QS40) with nitrogen fertilizers improves sunflower (*Helianthus annuus* L.) productivity and fertility of aridisol // Applied Soil Ecology. – 2016. – Vol. 108. – P. 238-247.
- 4 Tabassum B., Khan A. Muhammad Tariq Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR // Applied Soil Ecology. – 2017. – Vol. 121. – P. 102-117.
- 5 Chauhan H., Bagyaraj D.J., Selvakumar G., Sundaram S.P. Novel plant growth promoting rhizobacteria - Prospects and potential // Applied Soil Ecology. – 2015. – Vol. 95. – P. 38-53.
- 6 Shrivastava P., Kumar R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2015. – Vol. 22, № 2. – P. 123-131.
- 7 Владимиров Ю.А. Инактивация ферментов ультрафиолетовым облучением // Соросовский образовательный журнал. -2001. -Т.7, №2. -С. 20–27.
- 8 Bhagwan H.V., Akkiraju P.C. Effect of physical and chemical mutagens on rhizobium and study of mutated rhizobium activity on seed germination and antibiotic sensitivity // International Journal of Advanced Research. – 2015. – Vol. 3, № 6. – P. 1045-1056.
- 9 Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно. – Владимир: Изд-во ВлГУ, 2005. – 76 с.
- 10 Лысак В. В. Микробиология : Учебное пособие. – Минск : БГУ, 2007. - 430 с.
- 11 Дерябина Г.И., Потапова И.А., Нечаева О.Н. Практикум по органической химии. Часть I. Методы очистки и идентификации органических соединений // Учебное пособие. –Самара: «Универс-Групп», 2005. – 84 с.
- 12 KamalaKumari P. V., Sankar G. G., Prabhakar T. Strain improvement studies for the production of L-asparaginase by *Beauveria bassiana* SS18/41 // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. – 2015. – Vol. 31(2). – P. 173-176.
- 13 Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер.с англ. – М.: Практика. – 1998. – 459 с.

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА*, О.Н. ШЕМШУРА, Г.А. МОМБЕКОВА, Ж.Н. ШЕМШЕЕВА
«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы,
Қазақстан

* e-mail: gnj40@inbox.ru

ӨСІМДІКТІҢ ӨСІРУІН ЖҮРГІЗЕТІН PGPR БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ ӨСІРУІН АРҚЫЛАНДЫРУ ӘРЕКЕТІНЕ УЛЬТРАКҮЛГІН СӘУЛЕЛЕНУДІҢ ӘСЕРІ

Түйін

Мақалада ультракүлгін сәулеленуге ұшыраған Өсімдіктердің өсуіне ықпал ететін ризобактериялардың мутантты штамдарының (PGPR - бактериялар) "Победа-54" мәш және Інжу - 077 бұршақ тұқымдарының өнгіштігі мен өну энергиясына әсерін зерттеу нәтижелері келтірілген. Зерттеу нысаны ретінде *Pseudomonas putida* 4/1, *Azotobacter chroococcum* P29 және *Bacillus subtilis* қолданылды. PGPR-бактериялардың үш коллекциялық штаммының УК-сәулеленуін жүргізу нәтижесінде моноизолаттардың 1%-дық өмір сүруіне УК-сәулелермен 60 минут сәулелендіру кезінде қол жеткізілетіні анықталды.

Алынған мутантты штамдармен мәш тұқымын өңдеу тұқымның өнуіне ризобактериялардың бастапқы нұсқаларымен және бақылаумен салыстырғанда оң әсер етті. Алайда, бастапқы штамдармен салыстырғанда өсуді ынталандыру белсенділігінің артуы тек *Pseudomonas putida* M-1 мутантты штаммында байқалды. Бұл жағдайда сабақтар мен тамырлардың ұзындығы тұқымдары бастапқы штамммен өңделген өсімдіктердің осы көрсеткіштерімен салыстырғанда орташа есеппен 1,2 есе (сабағы) және 1,08 есе (тамыры), ал бақылаумен салыстырғанда сәйкесінше 2,9 және 2,6 есе өсті.

Бұршақ тұқымдарын зерттелген бактериялардың мутантты штамдарымен емдеу тұқымның өнуіне де, тамыр мен сабақтың өсуіне де бастапқы нұсқалармен және бақылаумен салыстырғанда оң әсер етпеді.

Кілтті сөздер: PGPR бактериялары, ультракүлгін сәулелену, мутагенез, мәш, бұршақ.

IRSTI: 62.09.39

ZH.B.SULEIMENOVA*, O.N.SHEMSHURA, G.A.MOMBEKOVA, ZH.N. SHEMSHEYEVA
LLP «Research and Production Center of Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan

* e-mail: gnj40@inbox.ru

EFFECT OF ULTRAVIOLET IRRADIATION ON THE GROWTH- STIMULATING ACTIVITY OF PGPR BACTERIA THAT PROMOTES PLANT GROWTH

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.01

Summary

The article presents the results of a study of the effect of mutant strains of rhizobacteria that promote plant growth (PGPR bacteria) exposed to ultraviolet irradiation on the germination and germination energy of "Pobeda-54" mung bean seeds and "Inju-077" beans. *Pseudomonas putida* 4/1, *Azotobacter chroococcum* P29 and *Bacillus subtilis* were used as research objects. As a result of UV irradiation of three collection strains of PGPR bacteria, it was found that 1% survival of mono-isolates is achieved when irradiated with UV rays for 60 minutes.

The treatment of mash seeds with the obtained mutant strains had a positive effect on seed germination compared to the treatment of seeds with the initial variants of rhizobacteria and control. However, an increase in growth-stimulating activity compared to the original strains was noted only in the mutant strain *Pseudomonas putida* M-1. The length of the stem and roots increased by 1.2 times (stem) and 1.08 times (root) compared to stems and roots length of seeds treated with the original strain and control - by 2.9 and 2.6 times, respectively.

The treatment of bean seeds with bacterial mutant strains did not have a positive effect neither on seed germination nor on the growth of the root and stem compared to the initial variants and control.

Key words: PGPR bacteria, UV irradiation, mutagenesis, mung bean, beans

The demand for environmentally friendly products is constantly growing in the world, and the need of agriculture for safe biological preparations is increasing every year. Recently, more and more attention of scientists has been focused on the creation of biological products based on rhizobacteria that stimulate plant growth - PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). The use of biological preparations based on PGPR bacteria in agricultural practice is one of the technological methods that contribute to increasing the yield of agricultural crops [1, 2].

PGPR bacteria have a positive effect on plants, namely, they have the ability to fix the molecular nitrogen of the atmosphere, synthesize substances of hormonal nature (auxins, gibberelins, cytokinins), vitamins, substances of antibiotic and antifungal nature, as well as the ability to decompose harmful chemical compounds. The use of PGPR bacteria promotes the stimulation of seed germination and plant growth, improves nitrogen nutrition of plants, the formation of nodules in legumes, suppresses the development of root rot of plants, etc. [3, 4].

Currently, the source of many genetic variations of microorganisms is mutagenesis, which allows to increase the productivity of producing strains and reduce the cost of their cultivation. To obtain highly active strains of rhizobacteria, methods of physical and chemical mutagenesis are used, which are an effective tool in increasing the activity of the studied cultures and are widely used in biotechnology [5, 6]. It is known that induced mutations are inherited genome changes resulting from certain mutagenic effects under artificial (experimental) conditions or under adverse environmental influences. The mutation is induced using mutagenic factors of physical and chemical nature. The high mutability of bacteria is associated with the peculiarities of the organization of the genome, as well as with their high rate of reproduction and growth. The absorption of light by nucleic acids underlies the mutagenic and bactericidal effects of UV radiation. In this case, damage occurs not only in the DNA molecule, but also repair enzymes are inactivated, which leads to mutations [7, 8].

It is known that induced mutagenesis is an effective tool for achieving genetic and functional changes in the body. For example, *Rhizobium* strains isolated from peanuts and fenugreek were subjected to UV mutagenesis, after which the resulting mutant strains were treated with mutagens of chemical nature (EtBr, Acrylamide and Tetra Methyl Ethylene Diamine - TEMED). Further, the effect of the obtained mutant strains on the germination and germination energy of peanut and mash seeds was studied. It was found that when treated with mutant strains of peanut seeds, 50% germination was observed, whereas when treated with mutant strains of masha seeds, germination was significantly higher - about 70-80% [8]. Thus, induced mutagenesis is a convenient tool for achieving genetic and functional changes in the body.

The purpose of this study was to study the effect of ultraviolet radiation on the growth-stimulating activity of PGPR bacteria.

Materials and methods

The objects of research were bacteria from the collection of LLP "SPC Microbiology and Virology": *Pseudomonas putida* 4/1, *Azotobacter chroococcum* P29 and *Bacillus subtilis*. "Inzhu-077" bean seeds and "Pobeda-54" mung bean seeds were used as experimental plants. Standard microbiological and biochemical research methods were used in this study [9-11]. The initial cultures were grown on the following nutrient media: king B (*Pseudomonas putida* 4/1), pea medium (*Azotobacter chroococcum* P29), and meat-peptone agar (*Bacillus subtilis*) at a temperature of 300C.

UV mutagenesis was performed according to the method described by Kamala Kumari et al. [12]. As a mutagen, ultraviolet rays with a wavelength of 260 nm were used, at which the maximum absorption of UV light by DNA molecules is observed. Single colonies of PGPR bacteria were suspended in 3 ml of liquid nutrient medium. After that, 0.5 ml of each sample was added to 50 ml of liquid nutrient medium and cultured at 30°C (200 rpm) until the optical density reached 600 units. After 6 hours of incubation, the resulting culture fluid should correspond to the culture of the middle phase. After that, 20 ml of the culture liquid was taken and centrifuged for 10 minutes at 1700 rpm. The pellet was resuspended in phosphate buffer (pH 7.0), after which 15 ml of the suspension was exposed to UV rays using a UV lamp (30 W) with a wavelength of 260 nm for 30, 45 and 60 minutes (distance to the lamp 10 cm). Next used serial dilutions to calculate the percentage of lethality.

The obtained data were processed by the method of variance-statistical analysis, taking $P < 0.05$ as the probability criterion [13].

Results and discussion

A simple and convenient method of obtaining mutants of different types is UV irradiation. However, a high mutation rate is achieved here with low cell survival. During the experiment, ultraviolet rays with a wavelength of 260 nm were used, at which the maximum absorption of UV rays by DNA molecules is observed. In the course of research, it was found that ultraviolet irradiation causes a decrease in the viability of bacterial cells (Table 1).

Table 1 - The effect of ultraviolet irradiation on the colony-forming ability of PGPR bacteria

PGPR-bacteria	Irradiation time, min	Cell titer before irradiation, CFU/ml	Cell titer after irradiation, CFU/ml
<i>Pseudomonas putida</i> 4/1	30	$(8,8 \pm 3,28) \times 10^8$	$(6,5 \pm 2,11) \times 10^8$
	45		$(5,8 \pm 1,24) \times 10^7$
	60		$(9,0 \pm 1,26) \times 10^6$
<i>Azotobacter chroococcum</i> P29	30	$(9,7 \pm 3,21) \times 10^8$	$(5,3 \pm 3,21) \times 10^8$
	45		$(3,7 \pm 2,45) \times 10^7$
	60		$(9,1 \pm 2,28) \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i>	30	$(8,5 \pm 2,18) \times 10^8$	$(6,8 \pm 3,08) \times 10^8$
	45		$(3,0 \pm 2,27) \times 10^7$
	60		$(8,3 \pm 2,16) \times 10^6$

As can be seen from the data presented in Table 1, 1% of the survival of mono-isolates was observed under UV irradiation for 60 minutes. The cell titer was $9.0 \pm 1.26 \times 10^6$ CFU/ml for *Pseudomonas putida* 4/1, $9.1 \pm 2.28 \times 10^6$ CFU/ml for *Azotobacter chroococcum* P29, and $8.3 \pm 2.16 \times 10^6$ CFU/ml for *Bacillus subtilis*.

After that, the effect of the obtained mutant strains of PGPR bacteria on the germination and germination energy of “Pobeda-54” mung bean seeds and “Inju -077” bean seeds was studied. The germination energy is the percentage ratio of the number of germinated seeds to their total number on a certain, conditionally accepted germination day. This indicator is widely used not only in determining the quality of seeds (since seed germination is reduced at low germination energy), but also in studying various effects on seeds. Germination (viability) refers to the ability of seeds to produce normal seedlings for a certain period of time for each plant species under optimal germination conditions. Germination percentage is the ratio of the number of normal germinated seeds to their number taken for germination.

The germination energy was determined on the 4th day after the treatment of mash seeds and beans with culture liquid, while the germination of mash seeds was determined on the 7th day, and bean seeds - on the 5th day. The data obtained are shown in Tables 2 and 3.

Table 2 - Effect of PGPR bacteria on the germination energy and germination of bean seeds before and after UV irradiation

Strain		Number of seeds, 100 pcs		Length, cm	
		germination energy, % (4 days)	germination, % (5 days)	root	stem
Initial strain	<i>Pseudomonas putida</i> 4/1	75	81	6,3±0,2	20,0±0,3
	<i>Azotobacter chroococcum</i> P29	75	90	6,2±0,1	18,7±0,3
	<i>Bacillus subtilis</i>	81	90	7,2±0,2	21,3±0,2
Mutant strain	<i>Pseudomonas putida</i> M-1	75	85	5,1±0,2	16,5±0,3
	<i>Azotobacter chroococcum</i> M-1	79	85	4,5±0,1	13,0±0,3
	<i>Bacillus subtilis</i> M-1	72	80	6,5±0,4	13,2±0,2
Control		62	70	5,8±0,2	18,7±0,2

As can be seen from the data presented in Table 2, the treatment of bean seeds with mutant strains of *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacter chroococcum* M-1 and *Bacillus subtilis* M-1 did not have a positive effect neither on the germination energy and seed germination, nor on root and stem growth compared to control.

Table 3 - Effect of PGPR bacteria on germination energy and germination of mung bean seeds before and after UV irradiation

Strain		Quantity, 100 pcs.		Length, cm	
		germination energy, % (4 days)	germination, % (7 days)	root	stem
Initial strain	<i>Pseudomonas putida</i> 4/1	75	90	10,0±0,2	8,8±0,3
	<i>Azotobacter chroococcum</i> P29	75	100	5,1±0,3	8,9±0,2
	<i>Bacillus subtilis</i>	81,5	100	4,9±0,3	17,3±0,1
Mutant Strain	<i>Pseudomonas putida</i> M-1	75	95	10,8±0,1	10,6±0,2
	<i>Azotobacter chroococcum</i> M-1	79	100	4,0±0,3	8,2±0,3
	<i>Bacillus subtilis</i> M-1	72	95	4,8±0,2	11,1±0,1
Control		62	80	4,1±0,3	3,6±0,2

As can be seen from the data presented in Table 3, the treatment of Pobeda-54 mung bean seeds with mutant strains of *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacter chroococcum* M-1 and *Bacillus subtilis* M-1 had a positive effect on seed germination compared with seed treatment with the initial variants of rhizobacteria and control. At the same time, an increase in growth-stimulating activity compared to the Initial strains was noted only in the mutant strain *Pseudomonas putida* M-1. The length of the stem and roots increased in this case compared to the original strain by 1.2 times (stem) and 1.08 times (root), and compared to the control - by 2.9 and 2.6 times, respectively.

Thus, as a result of UV irradiation of three collection strains of PGPR bacteria, it was found that 1% of the survival of mono-isolates is achieved when irradiated with UV rays for 60 minutes. The treatment of mung bean seeds with the obtained mutant strains *Pseudomonas putida* M-1, *Azotobacter chroococcum* M-1 and *Bacillus subtilis* M-1 had a positive effect on the germination of mung bean seeds compared with the treatment of seeds with the initial variants of rhizobacteria and control. At the same time, an increase in growth-stimulating activity compared to the original strains was noted only in the mutant strain *Pseudomonas putida* M-1. The treatment of bean seeds with mutant strains of the studied bacteria did not have a positive effect neither on seed germination nor on the growth of the root and stem compared to the treatment of seeds with the initial variants of rhizobacteria and control.

References:

- 1 Tchakounté G.V.T., Berger B., Patz S., Fankem H., Ruppel S. Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil // Microbiological Research. – 2018. – Vol. 214. P. 47-59.
- 2 Song X., Liu M., Wu D., Griffiths B.S., Jiao J., Li H., Hu F. Interaction matters: Synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field // Applied Soil Ecology. – 2015. – Vol. 89. – P. 25-34.
- 3 Arif M.S., Riaz M., Shahzad S.M., Buttler A. Associative interplay of plant growth promoting rhizobacteria (*Pseudomonas aeruginosa* QS40) with nitrogen fertilizers improves sunflower (*Helianthus annuus* L.) productivity and fertility of aridisol // Applied Soil Ecology. – 2016. – Vol. 108. – P. 238-247.
- 4 Tabassum B., Khan A. Muhammad Tariq Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR // Applied Soil Ecology. – 2017. – Vol. 121. – P. 102-117.
- 5 Chauhan H., Bagyaraj D.J., Selvakumar G., Sundaram S.P. Novel plant growth promoting rhizobacteria - Prospects and potential // Applied Soil Ecology. – 2015. – Vol. 95. – P. 38-53.
- 6 Shrivastava P., Kumar R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2015. – Vol. 22, № 2. – P. 123-131.
- 7 Vladimirov Iu.A. Inaktivatsiia fermentov ultrafioletovym oblucheniem // Sorosovskii obrazovatelnyi zhurnal. -2001. -T.7, №2. -S. 20–27.
- 8 Bhagwan H.V., Akkiraju P.C. Effect of physical and chemical mutagens on rhizobium and study of mutated rhizobium activity on seed germination and antibiotic sensitivity // International Journal of Advanced Research. – 2015. – Vol. 3, № 6. – P. 1045-1056.
- 9 Pruntova, O.V. Laboratornyj praktikum po obshchej mikrobiologii / O. V. Pruntova, O. N. Sahno. – Vladimir: Izd- vo VIGU, 2005. – 76 s.
- 10 Lysak V. V. Mikrobiologiya : Uchebnoe posobie. – Minsk: BGU, 2007.- 430 s.
- 11 Deryabina G.I., Potapova I.A., Nechaeva O.N. Praktikum po organicheskoy himii. CHast' I. Metody ochistki i identifikatsii organicheskikh soedinenij // Uchebnoe posobie. –Samara: «Univers-Grupp», 2005. – 84 s.
- 12 Kamala Kumari P. V., Sankar G. G., Prabhakar T. Strain improvement studies for the production of L-asparaginase by *Beauveria bassiana* SS18/41 // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. – 2015. – Vol. 31(2). – P. 173-176.
- 13 Glanc S. Mediko-biologicheskaya statistika / per.s angl. – M.: Praktika. – 1998. – 459 s.

МРНТИ: 34.57.21

Н.Н. ГАВРИЛОВА¹, А.К. САДАНОВ¹, И.А. РАТНИКОВА^{1*}, Е.Ж. ШОРАБАЕВ²,
С.Э. ОРАЗЫМБЕТ¹, Г.К. ТАУБЕКОВА², Р.Ж., КАПТАГАЙ¹, Л.А. КОШЕЛЕВА¹,
У.Ж. КЕРЕМБЕКОВА¹, Ж.Т. МУСАБЕКОВ¹, С.Б. ДЖАЙЛАУОВА¹

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Алматы, Казахстан

²ТОО «Промышленная микробиология», Алматы, Казахстан

*e-mail: iratnikova@list.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ «БЕНТОБАК» ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.02

Аннотация

Разработана оптимизированная пробиотическая кормовая добавка «Бентобак» на основе целлюлолитических бактерий *Cellulomonas flavigene*-22 и пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii* C-8, превосходящая исходную по антимикробной активности, целлюлолитической активности, содержанию витамина В₁₂, содержанию жизнеспособных бактериальных клеток в жидкой культуре, бактериальной пасте и сухой кормовой добавке.

Производственные испытания оптимизированного препарата «Бентобак» при откорме крупного рогатого скота показали, что среднесуточный привес животного составляет от 770 до 1400 г на голову в сутки и зависит от продолжительности приема биопрепарата и породы скота.

Анализ мясных продуктов, взятых из крестьянских хозяйств, участвовавших в эксперименте, показал, что все они соответствовали по органолептическим, химическим и микробиологическим показателям мясу крупного рогатого скота по ГОСТ 7269–79. Отсутствие в отобранных образцах мяса сульфата меди и патогенных микроорганизмов также подтверждает их пригодность.

Ключевые слова: целлюлолитические, пропионовокислые бактерии, бентонит, кормовая добавка, эффективность.

Ведущее место в развитии животноводства отводится кормопроизводству в связи с тем, что корма определяют количество и качество животноводческой продукции, дают возможность раскрыться генетическому потенциалу животных.

Известно, что организм животных и птицы не способен самостоятельно синтезировать многие витамины, аминокислоты и минеральные элементы, их главным источником являются корма. Поэтому недостаток в кормах биологически активных веществ, макро- и микроэлементов отрицательно влияет на жизнедеятельность и продуктивность животных.

При недостатке в рационах животных витаминов нарушается образование ферментов, и, следовательно, протекание и регуляция биосинтеза, а также нарушаются специфические функции клеток, что влечет за собой снижение продуктивности животных [1].

Минеральные вещества необходимы животным для всех процессов обмена веществ, для построения костяка, а также в качестве активаторов ферментов и структурных элементов, непосредственно участвуют в процессах пищеварения, регулируют осмотическое давление и поддерживают в организме кислотно-щелочное равновесие. Обмен белков, углеводов, жиров, водный режим и гормональное функционирование организма невозможны без активного участия минеральных веществ. Именно поэтому

потребность животных в минеральных веществах должна удовлетворяться ежедневно, равномерно и в научно рекомендуемых соотношениях [2].

Недостаток, отсутствие или дисбаланс незаменимых аминокислот в рационах животных сопровождается ухудшением использования протеина, нарушением обмена веществ, снижением продуктивности [3].

Проблему обеспеченности животных биологически полноценными компонентами рационального питания решают с помощью кормовых добавок – специфических дополнителей к ежедневному рациону питания птицы, свиней и крупного рогатого скота [4-6].

В настоящее время рынок кормовых добавок для животных и птицы довольно разнообразен. Однако далеко не все они равноценны по составу и эффективности. В большинстве своём это премиксы, которые состоят из смеси белков, витаминов, минералов и носителя [7-11].

Известно, что минеральные и витаминные добавки существенно повышают эффективность использования концентрированных кормов в животноводстве. При этом увеличивается мясная, молочная, яичная, шерстная продуктивность в среднем на 10–25%, сокращается расход кормов на единицу продукции на 8–15%, заболеваемость и падеж животных - на 20-40% [12].

Ввод необходимых кормовых добавок в рацион животных в достаточном количестве позволяет получить высококачественные мясо, молоко, яйца при максимальной продуктивности поголовья и сокращении расходов на корма и содержание [13,14]. Ужесточение требований к экологической безопасности продукции животноводства заставило во всем мире пересмотреть многие методические подходы к вопросам оптимизации контроля над эпизоотическим процессом болезней, возбудителями которых является условно-патогенная микрофлора, и признать необходимость разработки нового поколения экологически безопасных препаратов, способных обеспечить биологическую защиту сельскохозяйственных животных и птицы. Наиболее полно этим требованиям могут отвечать пробиотические кормовые добавки и препараты, в состав которых входят живые бактерии из числа основных представителей нормального кишечного микробиоценоза животных и птицы [15-19].

К основным эффектам пробиотиков относятся улучшение пищеварения, иммуностимулирующее действие и повышение продуктивности животных.

Наиболее эффективными являются комбинированные пробиотические кормовые добавки. В их состав входят, наряду с пробиотическими микроорганизмами, различные витамины, аминокислоты, ферменты, минералы.

В настоящее время привлекают внимание сорбированные пробиотические кормовые добавки, в которых живые микроорганизмы адсорбированы на сорбенте-носителе, в качестве которого обычно используют уголь активированный или углерод-минеральные соединения. Такие препараты позволяют добиться более плотной колонизации на слизистых оболочках, быстрого восстановления микрофлоры кишечника и купирования патологических процессов в нем.

Широкое распространение получили кормовые добавки на основе бентонита. Бентониты дают наиболее высокий эффект в составе обыкновенных, так называемых хозяйственных рационов, недостаточно сбалансированных по макро- и микроэлементам, протеину и энергии. Особенно важное значение они имеют при использовании в кормлении жвачных синтетических азотсодержащих веществ на фоне рационов, недостаточно обеспеченных сахаром в зимне-стойловый период, и при скармливании богатых протеином кормов зеленого конвейера в летнее время [20].

Использование природных минералов позволяет резко сократить количество применяемых в производстве мяса ростостимулирующих и лечебных препаратов и повысить безопасность продукции животноводства для человека.

Ранее в Центре микробиологии и вирусологии КН МОН РК разработана кормовая добавка «Бентобак» (А.с. № 1684972) на основе пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii*-15 и целлюлолитических бактерий *Cellulomonas flavigena*-22, адсорбированных на бентоните, способствующая лучшему усвоению грубых кормов, нормализации белкового обмена, снижению риска ацидоза у животных, повышению их продуктивности.

Испытание препарата «Бентобак» на овцах казахской тонкорунной породы показало, что введение его в рацион животных из расчета 1,5 г на один кг массы тела животного приводит к понижению состава азотистых веществ и повышению содержания витамина В₁₂ в рубцовом содержимом и в химусе 12-ти перстной кишки, значительному увеличению процента переваримости клетчатки. Под влиянием исследуемого препарата в крови снижается содержание аммиака и мочевины при незначительном увеличении летучих жирных кислот. Отмечено увеличение резервной щелочности крови. Этот факт имеет важное значение, так как при истощении щелочных резервов в организме отмечается склонность животных к заболеванию ацидозом. Дополнительный прирост живой массы составил 120 г в сутки, что приблизительно дает за 100 дней откормочного периода прибавление массы тела животного на 12 кг.

Приведенные факты свидетельствуют о высокой эффективности препарата «Бентобак» и перспективности его широкого внедрения в практику.

Для повышения антагонистической активности препарата в отношении возбудителей кишечных инфекций, содержания в нем клеток пробиотических бактерий и витамина В₁₂ в составе препарата штамм *P. shermanii*-15 заменен на *P. shermanii*-С-8. Благодаря этому, кормовая добавка «Бентобак» способствует лучшему усвоению грубых кормов, нормализации белкового обмена, снижению риска ацидоза у животных, повышению их продуктивности [21].

В связи с изложенным, проведенные исследования направлены на повышение эффективности кормовой добавки за счет использования в ее составе нового штамма пропионовокислых бактерий с широким спектром биологической активности, а также разработки технологии производства сухого препарата «Бентобак» и его производственных испытаний на сельскохозяйственных животных в крестьянских хозяйствах.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили целлюлолитические бактерии *Cellulomonas flavigena*-22, пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii* 15, *Propionibacterium shermanii* С-8. Штаммы бактерий выращивали на питательной среде, используемой для совместного культивирования пропионовокислых и целлюлолитических бактерий, следующего состава (г/л): кукурузный экстракт - 30,0; крахмал - 10,0; глюкоза - 10,0; КН₂РО₄ - 1,0; MgSO₄×7Н₂О - 0,5; KCL - 0,5; (NH)₂SO₄ - 2,5; СоСL₂ - 0,01; вода - до 1000 мл (рН 6,8-7,0).

Определение численности микроорганизмов проводили путем ряда последовательных разведений в стерильной водопроводной воде и высева их в агаризованную питательную среду с последующим подсчетом выросших колоний [22].

Количественное содержание витамина В₁₂ устанавливали микробиологическим методом по зонам роста витаминзависимого штамма *E. coli* 133-3 и рассчитывали по таблице Дмитриевой.

Производственные испытания препарата «Бентобак» проводили в ТОО «Пчелка», с. им. Х. Бижанова Енбекшиказахского района Алматинской области, а также в крестьянских хозяйствах «Нурбол-И» Жанакорганского района, «Ыссамадин» Сырдарьинского района и ТОО «Сыр Маржаны» Казалинского района путем ежедневного добавления препарата при откорме в общий рацион из расчета 1,5 г на 1 кг живого веса крупного рогатого скота.

Результаты исследований и обсуждение

С целью расширения биологической активности исходной пробиотической кормовой добавки «Бентобак» в ее состав введен штамм *P. shermanii*-C-8 взамен *P. shermanii*-15.

Для сравнения исходный штамм *P. shermanii*-15 и новый *P. shermanii*-C-8 выращивали на питательной среде, используемой для совместного культивирования пропионовокислых и целлюлолитических бактерий. Культивирование проводили в термостате при температуре 28-30⁰С в течение 18–20 часов, затем в жидких культурах определяли титр бактерий и определение содержания витамина В₁₂ путем посева соответствующих разведений на твердую питательную среду приведенного выше состава (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика продуктивности штаммов пропионовокислых бактерий

Штамм	pH	Кислотность, ⁰ T	Титр, млрд., КОЕ/мл	Содержание витамина В ₁₂ , ед/мг
<i>P. shermanii</i> 15	5,8	61,0	2,0	0,25
<i>P. shermanii</i> C-8	5,5	67,0	6,5	2,80

Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют, что штамм *P. shermanii* C-8 превосходит *P. shermanii*-15 по накоплению бактериальных клеток в 3 раза, витамина В₁₂ – в 11 раз.

При наработке сухой кормовой добавки использовали штаммы бактерий *Cellulomonas flavigene*-22, *P. shermanii* C-8 или *P. shermanii*-15.

Маточную расплодку штаммов бактерий выращивали на питательной среде в колбах в термостате при температуре 28-30⁰С в течение 18–20 ч. Засев колб с 300 мл питательной среды культурами целлюлолитических и пропионовокислых бактерий производили со скошенной агаризованной среды. Посевной материал бактерий выращивали в колбах в количестве 1,5 л в течение 20 ч. Нарботку культуральной жидкости целлюлолитических и пропионовокислых бактерий производили в ферментере вместимостью 30 л без аэрации при избыточном давлении 0,3-0,5 атм. в питательной среде для посевного материала. Культивирование бактерий осуществляли при следующем режиме: температура культивирования – 28-30⁰С; избыточное давление в аппарате – 0,3-0,5 атм.; время культивирования – 18-24 часа.

В культуральную жидкость, полученную после ферментации, добавляли растворенный в питьевой воде бентонит (3%) и хлористый калий (0,1%), смесь хорошо перемешивали и оставляли в прохладном месте на три часа. За это время биомасса адсорбировалась на бентоните и осаждалась. Надосадочную жидкость декантировали, оставшийся осадок центрифугировали при 3000 об/мин. В отцентрифугированную биомассу бактерий добавляли защитные компоненты: глюкоза – 10%, уксуснокислый натрий – 0,5%, лимоннокислый натрий – 0,5% и хорошо перемешивали на механической мешалке. Затем бактериальную биомассу высушивали сублимационным способом при

следующем режиме: замораживание продукта при 40⁰С в течение 6 часов; температура плит 10⁰С; температура досушивания продукта 20-25⁰С, разряжение 45 мА; продолжительность сушки 20–24 часа. В сухих кормовых добавках определяли содержание жизнеспособных клеток, витамина В₁₂ и целлюлолитическую активность чашечным методом по зонам гидролиза Na-КМЦ.

Результаты по содержанию титров бактерий представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели качества сухих кормовых добавок, полученных сублимационным способом

Штамм	Титр жидкой культуры, млн. КОЕ/г	Титр пасты, млн. КОЕ/г	Титр сухого препарата, млн. КОЕ/г	
			ПКБ	ЦЛБ-22
ЦЛБ-22+ПКБ-С-8	500	6400	840	1600
ЦЛБ-22+ПКБ-С-15	520	2780	360	370

Как видно из представленной таблицы, содержание бактериальных клеток в жидкой культуре, бактериальной пасте и сухой кормовой добавке выше в вариантах со штаммом *P. shermanii* С-8, при этом предложенный штамм оказывает стимулирующее действие на рост целлюлолитических бактерий.

Таким образом, разработана оптимизированная пробиотическая кормовая добавка «Бентобак» на основе целлюлолитических *Cellulomonas flavigene*-22 и пропионовокислых бактерий *Propionibacterim. shermanii* С-8 с повышенной биологической активностью. Она превосходит исходную по содержанию в ней пробиотических бактерий и витамина В₁₂.

Для изучения сохранности жизнеспособных клеток в пробиотической кормовой добавке в условиях холодильника наработаны 10 партий препарата на основе адсорбированных на бентоните целлюлолитических и пропионовокислых бактерий, входящих в состав кормовой добавки. Содержание жизнеспособных клеток в пробиотическом препарате при хранении определяли путем высева из соответствующих разведений на плотные питательные среды. Препарат хранился от одного до двенадцати месяцев (таблица 3).

Таблица 3 – Карта хранения пробиотической кормовой добавки в холодильнике

Содержание жизнеспособных клеток в пробиотическом препарате после хранения, млн. КОЕ/г						
№ партии	исходное	через 1 месяц	через 2 месяца	через 5 месяцев	через 7 месяцев	через 12 месяцев
1	22,0±0,4	20,0±0,5	18,5±0,6	18,0±0,7	17,0±0,3	15,0±0,4
2	14,2±0,6	14,0±0,2	14,1±0,4	13,5±0,7	13,0±0,2	12,5±0,6
3	12,9±0,4	12,5±0,3	12,1±0,6	12,2±0,5	12,1±0,4	12,0±0,4
4	23,0±0,6	22,4±0,7	20,5±0,8	20,0±0,5	20,0±0,7	18,0±0,4
5	19,5±0,3	19,0±0,5	19,4±0,6	18,0±0,6	19,9±0,7	19,0±0,5
6	14,5±0,3	14,3±0,4	14,1±0,6	14,2±0,3	14,0±0,4	13,9±0,2
7	18,0±0,3	18,1±0,5	18,0±0,6	18,0±0,4	17,8±0,4	17,5±0,6
8	25,0±0,6	25,1±0,4	22,5±0,7	22,3±0,7	20,7±0,4	19,7±0,5
9	19,4±0,3	18,9±0,5	18,0±0,5	16,3±0,4	16,0±0,4	15,8±0,6
10	17,4±0,3	17,5±0,5	17,0±0,4	16,9±0,2	16,8±0,4	16,5±0,3

Как видно из представленной таблицы, содержание жизнеспособных клеток в препарате остается стабильным и к 12 месяцам хранения составляет 12,0 ±0,4–19,7±0,5 млн. КОЕ/г по сравнению с исходным - 12,9±0,4–25,0±0,6 млн. КОЕ/г.

Таким образом, гарантированный срок сохранения жизнеспособных бактериальных клеток в кормовой добавке равен двенадцати месяцам в условиях холодильника.

Производственные испытания оптимизированного препарата «Бентобак» при откорме крупного рогатого скота в течение 30 дней проведены в ТОО «Пчелка» Енбекшиказахского района Алматинской области.

В опыте были использованы 25 быков от 12-месячного до 1,5-годовалого возраста (таблицы 4, 5, 6).

Таблица 4 – 1-я группа животных

Вид животного, возраст	Масть	Инвентарный номер	Вес, кг		Привес, кг/сут
			до опыта	после опыта	
Бычок, 1,0	Белоголовый	91322142	375	433	1,9
Бычок, 1,0	Серый	60302914	256	296	1,3
Бычок, 1,0	Белоголовый	90962784	345	398	1,7
Бычок, 1,0	Черный	60302912	250	302	1,7
Бычок, 1,8	Бурый	59922468	410	465	1,8
Бычок, 1,0	Тигровый	60302911	352	397	1,5
Бычок, 1,0	Белоголово-черный	60302732	287	330	1,4
Бычок, 1,0	Белоголово-красный	60302731	350	408	1,9
Бычок, 1,0	Черный	б/н	392	435	1,4
Бычок, 1,0	Белоголовый	91322173	334	385	1,7
Средний вес за 1 месяц			335,1	384,3	1,7

Таблица 5 – 2-я группа животных

Вид животного, возраст (год)	Масть	Инвентарный номер	Вес, кг		Привес кг/сут.
			до опыта	после опыта	
Бычок, 1,5	Бурый	60302735	402	454	1,7
Бычок, 1,5	Белоголовый	91121155	349	396	1,5
Бычок, 1,2	Черно-пестрый	60302730	330	378	1,6
Бычок, 1,2	Бурая	60302913	248	285	1,2
Бычок, 1,5	Белоголово-черный	91322150	395	440	1,5
Бычок, 1,5	Черный	60302916	363	400	1,2
Бычок, 1,0	Белоголовый	90962785	340	373	1,1
Бычок, 1,5	Черный	60302917	393	440	1,6
Бычок, 1,5	Белоголовый	91322128	350	400	1,7
Бычок, 1,0	Белоголовый	91322129	380	425	1,5
Средний вес за 1 месяц			355	399,9	1,4

Таблица 6 – Контрольная группа животных

Вид животного, возраст	Масть	Инвентарный номер	Вес, кг		Привес кг/сут.
			до опыта	после опыта	
Бычок, 1,0	Белоголовый	91322135	346	361	0,5
Бычок, 1,0	Бурая	91322145	350	362	0,4
Бычок, 1,0	Черный	60302733	340	358	0,6
Бычок, 1,0	Белоголовый	91322171	393	403	0,3
Бычок, 1,0	Белоголовый	91322146	320	332	0,4
Средний вес за 1 месяц			349,8	363,3	0,4

Установлено, что в результате применения оптимизированного препарата «Бентобак» в течение 30 дней среднесуточный привес животных составил в среднем 1400

г по сравнению с 0,4 г контрольных животных, не получавших биопрепарат (таблицы 6–8). Отмечено также, что использование препарата «Бентобак» при кормлении способствует улучшению общего физиологического состояния животных, в том числе азотистого обмена в организме, увеличению степени использования питательных веществ и их всасывания. Введение в рацион животных кормовой добавки «Бентобак» ускоряет процесс набора живой массы.

Испытание оптимизированного препарата «Бентобак» при откорме крупного рогатого скота проведено также в хозяйствах Кызылординской области.

В ТОО «Сыр Маржаны» Казалинского района количество отобранного скота для эксперимента составило 33 поголовья со средним весом 203 кг. Препарат задавали ежедневно вместе с кормом в количестве 304,5 г на голову. Длительность откорма скота составила 45 дней. Общее количество скота в контрольной группе, не получавшей препарат, составляло 46 голов со средним весом 276 кг.

Результаты испытаний представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты использования биопрепарата в ТОО «Сыр Маржаны» Казалинского района

Вариант	Исходный средний вес крупного рогатого скота, кг	Средний вес после 45 дней, кг	Дополнительный вес, прибавленный с помощью биопрепарата, кг
Опыт	203	245,8	42,8
Контроль	276	297	21

Установлено, что при откорме 33 голов крупного рогатого скота с добавкой в корм нового варианта биологического препарата «Бентобак» в течение 45 дней прибавка в весе составила 42,8 кг по сравнению с 21 кг в контрольной группе животных.

В этом же хозяйстве проведены исследования по применению биологического препарата «Бентобак» для кормления крупного рогатого скота венгерской «Гольштин-Фриз» породы (15 голов), вес которого в среднем составлял 194,13 кг. Животным ежедневно давали по 320 г испытуемого препарата на голову в течение 90 дней. По результатам исследования прибавка в весе составила 112,5 кг на одно животное или 1200 г в день.

В крестьянском хозяйстве «Нурбол-И» Жанакорганского района в экспериментальной группе содержалось 7 голов скота со средним весом 180 кг. Возраст 1 год 5 месяцев. Отобранное поголовье ежедневно получало новый вариант биопрепарата «Бентобак» вместе с кормом в количестве 270 г на голову в течение 60 дней. По результатам исследования средняя живая масса крупного рогатого скота через 60 дней составляла 231 кг, т.е. с помощью биопрепарата прибавка в весе в среднем составила 51 кг, это 850 г в день на голову.

В этом же крестьянском хозяйстве при откорме крупного рогатого скота со средним весом 249 кг в течение 30 дней ежедневная добавка препарата «Бентобак» составляла по 375 г на голову. После окончания эксперимента средняя живая масса крупного рогатого скота составила 272 кг. С помощью биопрепарата одно животное прибавило в весе 23 кг, это 770 г в день.

В крестьянском хозяйстве «Ысамадин» Сырдарьинского района в экспериментальной группе содержалось 17 голов крупного рогатого скота со средним весом 225 кг. Препарат добавляли ежедневно в корм в количестве 337,5 г на голову в течение 60 дней. После окончания откорма средний вес одного животного составил 296,4 кг. Следовательно, с помощью биопрепарата одно поголовье крупного рогатого скота прибавило в весе 71,4 кг, что составляет 1200 г в день.

Установлено, что дополнительный привес скота в хозяйствах зависит от продолжительности приема биопрепарата и породы скота.

Из крестьянских хозяйств, участвовавших в эксперименте, взяты образцы мяса крупного рогатого скота для химических анализов.

Анализ мясных продуктов проводили в Кызылординском областном филиале РГП «Республиканская ветеринарная лаборатория» Комитета ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

Результаты химического анализа мяса приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Химический анализ говядины

Название крестьянского хозяйства	Органолептические показатели	pH (средний показатель)	Сульфат меди	Инвазивные болезни	Бактериоскопия
ТОО «Сыр Маржаны» Казалинский район	в соответствии с ГОСТ	5,98	отрицательный	не обнаружено	роста нет
КХ «Ысамаддин» Сырдарьинский район	в соответствии с ГОСТ	5,9	отрицательный	не обнаружено	роста нет
КХ «Нурбол-И» Жанакорганский район	в соответствии с ГОСТ	5,96	отрицательный	не обнаружено	роста нет

Результаты исследований показали, что органолептические параметры мяса крупного рогатого скота соответствовали ГОСТ 7269-79 (цвет, внешний вид, концентрация, запах и т.д.). Другим признаком пригодности мяса является сульфат меди, который отсутствовал в исследуемых образцах по ГОСТ 23392-78. Установлено, что мясо, полученное из крестьянских хозяйств, не содержит микроорганизмы, вызывающие болезни.

Таким образом, разработана оптимизированная пробиотическая кормовая добавка «Бентобак» на основе целлюлолитических бактерий *Cellulomonas flavigene*-22 и пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii* C-8, превосходящая исходную по антимикробной активности, целлюлолитической активности, содержанию витамина В₁₂, жизнеспособных бактериальных клеток в жидкой культуре, бактериальной пасте и сухой кормовой добавке.

Разработана Технологическая инструкция по производству сухого биопрепарата «Бентобак». Гарантированный срок хранения биопрепарата по числу жизнеспособных клеток – 12 месяцев в условиях холодильника.

Производственные испытания оптимизированного препарата «Бентобак», проведенные в ТОО «Пчелка», с. им. Х. Бижанова Енбекшиказахского района Алматинской области путем его добавления в общий рацион из расчета 1,5 г на 1 кг живого веса крупного рогатого скота в течение 30 дней, показали, что среднесуточный привес животного составил 1400 г по сравнению с 0,4 г контрольного животного, не получавшего биопрепарат.

Испытания оптимизированного препарата «Бентобак» при откорме крупного рогатого скота в хозяйствах Кызылординской области показали, что дополнительный привес скота в хозяйствах составляет от 770 до 1200 г на голову в сутки и зависит от продолжительности приема биопрепарата и породы скота.

Анализ мясных продуктов, взятых из крестьянских хозяйств, участвовавших в эксперименте, показал, что все они соответствовали по органолептическим, химическим и микробиологическим показателям мясу крупного рогатого скота по ГОСТ 7269-79.

Другим признаком пригодности мяса является отсутствие в нем сульфата меди по ГОСТ 23392-78. Мясо, полученное из крестьянских хозяйств, не содержало микроорганизмы, вызывающие болезни.

Литература:

- 1 Все о животноводстве. Теория и практика, 2016. - URL: "<http://worldgonesour.ru/osnovy-zhivotnovodstva>" zivotnovodstva HYPERLINK.
- 2 Попова С. Роль минеральных элементов и витаминов в питании КРС, 2016. - URL: "<http://agropost.ru/>" ru. HYPERLINK.
- 3 Аминокислоты, 2014. - URL: "<http://worldgonesour.ru/korma/222-aminokisloty.html>" HYPERLINK.
- 4 Кощаев А.Г., Николаенко С.Н., Чистоусова М.С. Технология получения витаминной кормовой добавки из отходов консервной промышленности // Сборник научных трудов Sworld. - Одесса, 2008. - Т. 21. - № 1. - С.25-27.
- 5 Кощаев А.Г., Петенко А.И., А.З Хусид С.Б., Волкова С.А., Донсков Я.П. Разработка кормовой добавки на основе бентонита и отходов переработки риса // Молодой ученый. - 2015. - № 1. - С.135-138.
- 6 Жолобова И.С., Лунева А.В., Лысенко Ю.А. Влияние натрия гипохлорита на перепелов в период интенсивной яйцекладки // Птицеводство. - 2013. - № 07. - С.15-20.
- 7 Кощаев А.Г., Кощаева О.В., Николаенко С.Н., Харченко В.И. Особенности технологии получения коагулятов из сока люцерны // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. - 2014. - № 95. - С.720-728.
- 8 Способ получения белково-витаминной добавки. Кощаев А.Г., Бадякина А.О., Плутахин Г.А., Петенко А.И., Панков А.А., Панков С.А. Патент на изобретение RU 2197096 28.03.2000.
- 9 Патент на изобретение РФ № 2266680. Способ получения белковой кормовой добавки из растительного сырья и устройство для его осуществления / Кощаев А.Г., Плутахин Г.А., Петенко А.И. - Опубл. 12.04.2004.
- 10 Пат. РФ, № 2038800. Биопрепарат «РИАЛ» и способ кормления животных, птицы и пчел / Жаркова Г.Ю., Макаров Н.В., Рябинина Л.Ю. - Опубл. 09.07.1995.
- 11 Пат. РФ № 2422043. Селенсодержащий препарат для животноводства / Злотников К.М., Злотников А.К., Злотникова И.К. - опубл. 27.06.2011.
- 12 Бегнер Х., Кетц А. Научные основы питания сельскохозяйственных животных. – М.: Колос, 2010.
- 13 Кощаев А.Г., Николаенко С.Н., Фисенко Г.В., Саакян А.В. Физиолого-биохимическое обоснование применения бактериальной добавки Бацелл в составе растительных комбикормов на птице // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. - 2009. - Т. 2. - № 2-2. - С.140-143.
- 14 Пробиотическая кормовая добавка, 2020. - URL: "https://agrovektor.ru/physical_product/259034-probioticheskaya-kormovaya%20dobavka-dlya-krupnogo-rogatogo-skota-laktobifadol-forte.html" HYPERLINK
- 15 Anadyn A., Martnnez-Larranaga M.R., Aranzazu-Martnnez M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and Safety Assessment. Regulatory Toxicology // Pharmacology. - 2006. - Vol. 12. - P.91-95.
- 16 Гайдук А.Г., Хазиахметов Ф.С. Пробиотик Витафорт в рационах утят // Птицеводство. - 2011. - № 12. - С.27.
- 17 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Test of therapeutic and preventive effectiveness of probiotic // Abstr. of International Conference «Probiotics and Prebiotics». - Koshica, Slavenia, 2011. - P.87.
- 18 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A., Melnikov V.G. Probiotic Lactovit-K for fighting against coccidiosis infectious-invasive diseases of poultry and diseases of honey bees // Abstr. of XXXIV of the Society for Microbial Ecology and Disease. - Yokohama, Japan, 2011. - P. 33.
- 19 Бобровская И.В., Неминущая Л.А., Еремец Н.К., Провоторова О.В., Лихашерстова С.В., Еремец В.И., Самуйленко А.Я. Биотехнологии новых пробиотиков и синбиотических комплексов для сельскохозяйственных животных и птицы // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: мат. междунар. науч.-практ. конф. - Саратов, 2013. - С.8-10.

20 Петенко А.И., Лысенко Ю.А. Кормовые добавки в рационах перепелов // Птицеводство. - 2012. - № 9. - С.36-38.

21 Патент РК № 31262 Способ получения кормовой добавки Бентобак / Саданов А.К., Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А., Шорабаев Е.Ж. Опубл. 15.06.2016, бюл. № 6.

Н.Н. ГАВРИЛОВА¹, А.К. САДАНОВ¹, И.А. РАТНИКОВА^{1*}, Е.Ж. ШОРАБАЕВ²,
С.Э. ОРАЗЫМБЕТ¹, Г.К. ТАУБЕКОВА², Р.Ж., КАПТАГАЙ¹, Л.А. КОШЕЛЕВА¹,
У.Ж. КЕРЕМБЕКОВА¹, Ж.Т. МУСАБЕКОВ¹, С.Б. ДЖАЙЛАУОВА¹

¹ «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы,
Қазақстан

² «Өндірістік микробиология» ЖШС, Алматы қ. Қазақстан

*e-mail: iratnikova@list.ru

АУЫЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫ МАЛДАРЫНЫҢ ӨНІМДІЛІГІН АРТТЫРУ ҮШІН "БЕНТОБАК" ПРОБИОТИКАЛЫҚ ЖЕМШӨП ҚОСПАСЫН ОПТИМИЗАЦИЯЛАУ

Түйін

Cellulomonas flavigene-22 целлюлитикалық бактериялары және *Propionibacterim shermanii* с-8 пропионқышқылды бактериялары негізінде, бастапқы нұсқамен салыстырғанда микробқа қарсы белсенділігі мен целлюлолитикалық белсенділігі жоғары, құрамында В₁₂ витамині бар, бактериялық пастада және құрғақ жем қоспасында, сұйық культурада тіршілікке қабілетті бактерия жасушалары жоғары, пробиотикалық жем шөп қоспасы даярланды.

Ірі қара малды бордақылау кезіндегі «Бентобак» препаратының өндірістік тәжірибелері малдың орташа тәуліктік салмақ қосуы басына шаққанда 770-1400 г дейін құрайтынын және биологиялық өнімнің ұзақтығына және ірі қара малдың тұқымына байланысты екенін көрсетті. Экспериментке қатысқан шаруа қожалықтарынан алынған ет өнімдерін талдау олардың барлығы МС 7269-79 сәйкес ірі қара мал етінің органолептикалық, химиялық және микробиологиялық көрсеткіштеріне сәйкес келетіндігін көрсетті.

Еттің жарамдылығының тағы бір белгісі - МС 23392-78 сәйкес мыс сульфатының болмауы. Шаруа қожалықтарынан алынған ет құрамында ауру тудыратын микроорганизмдер болмады.

Кілтті сөздер: целлюлитті, пропионқышқылды бактериялар, бентонит, азықтық қоспа, тиімділік.

IRSTI: 34.57.21

N.N. GAVRILOVA¹, A.K. SADANOV¹, I.A. RATNIKOVA^{1*}, E.J. SHORABAEV²,
S.E. ORAZYMBET¹, G.K. TAUBEKOVA², R.J. KAPTAGAI¹, L.A. KOSHELEVA¹,
U.Zh. KEREMBEKOVA¹, J.T. MUSABEKOV¹, S.B. JAILAUOVA¹

¹LLP «Research and Production Center of Microbiology and Virology», Almaty, Kazakhstan

²LLP «Industrial Microbiology», Almaty, Kazakhstan

*e-mail: iratnikova@list.ru

OPTIMIZATION OF PROBIOTIC FEED ADDITIVE "BENTOBAK" FOR INCREASING PRODUCTIVITY OF FARM ANIMALS

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.02

Summary

An optimized probiotic feed additive «Bentobak» based on cellulolytic bacteria *Cellulomonas flavigene*-22 and propionic acid bacteria *Propionibacterium shermanii* S-8 superior in antimicrobial activity, cellulolytic activity, vitamin V12 content, viable bacterial cell content in liquid culture, bacterial paste and dry feed additive.

Production tests of the optimized «Bentobak» drug when fattening cattle showed that the average daily animal weight gain is from 770 to 1400 g per head per day and depends on the duration of taking the biologics and livestock breed.

Analysis of meat products taken from peasant farms participating in the experiment showed that all of them corresponded to organoleptic, chemical and microbiological indicators of cattle meat according to GOST 7269-79.

Another sign of the suitability of meat is the absence of copper sulfate in it in accordance with GOST 23392-78. Meat obtained from peasant farms did not contain microorganisms that cause diseases.

Keywords: cellulolytic, propionic acid bacteria, bentonite, feed additive, efficiency.

The leading place in the development of animal husbandry is given to feed production due to the fact that feed determines the quantity and quality of livestock products, makes it possible to reveal the genetic potential of animals.

It is known that the body of animals and birds is not able to independently synthesize many vitamins, amino acids and mineral elements, their main source is feed. Therefore, the lack of biologically active substances, macro- and microelements in feed negatively affects the vital activity and productivity of animals.

With a lack of vitamins in the animal diets, the formation of enzymes is disrupted, and, therefore, the course and regulation of biosynthesis, as well as the specific functions of cells, which entails a decrease in animal productivity [1].

Minerals are necessary for animals for all metabolic processes, for building a backbone, as well as activators of enzymes and structural elements, are directly involved in digestion processes, regulate osmotic pressure and maintain acid-base equilibrium in the body. The exchange of proteins, carbohydrates, fats, water regime and hormonal functioning of the body are impossible without the active participation of minerals. That is why the need of animals for mineral substances must be met daily, evenly and in scientifically recommended ratios [2].

The lack, absence or imbalance of essential amino acids in animal diets is accompanied by a deterioration in protein use, metabolic disorders, and a decrease in productivity [3].

The problem of providing animals with biologically complete components of rational nutrition is solved with the help of feed additives - specific additives to the daily diet of poultry, pigs and cattle [4-6].

Currently, the animal and poultry feed supplement market is quite diverse. However, not all of them are equivalent in composition and efficiency. Most of these are premixes, which consist of a mixture of proteins, vitamins, minerals and a carrier [7-11].

It is known that mineral and vitamin supplements significantly increase the efficiency of the use of concentrated feed in animal husbandry. Meat, milk, egg and wool productivity increases by 10-25% on average, fodder consumption per unit of production is reduced by 8-15%, morbidity and case of animals by 20-40% [12].

The introduction of the necessary feed additives into the diet of animals in sufficient quantities allows to obtain high-quality meat, milk, eggs with maximum livestock productivity and reduced costs of feed and maintenance [13,14].

The tightening of environmental safety requirements for livestock products has led the world to reconsider many methodological approaches to optimizing control over the epizootic process of diseases caused by opportunistic microflora, and to recognize the need to develop a new generation of environmentally friendly drugs that can ensure the biological protection of farm animals and poultry. Probiotic feed additives and preparations, which include live bacteria from among the main representatives of normal intestinal microbiocenosis of animals and birds, can most fully meet these requirements [15-19].

The main effects of probiotics include improving digestion, immunostimulating effect and increasing animal productivity.

The most effective are combined probiotic feed supplements. Their composition includes, along with probiotic microorganisms, various vitamins, amino acids, enzymes, minerals.

Currently, sorbed probiotic feed additives in which live microorganisms are adsorbed on a carrier sorbent, typically carbon activated or carbon-mineral compounds, have attracted attention. Such drugs make it possible to achieve denser colonization on the mucous membranes, rapid restoration of the intestinal microflora and stopping pathological processes in it.

Bentonite-based feed additives are widely used. Bentonites give the highest effect in the composition of ordinary, so-called economic diets, insufficiently balanced in macro- and microelements, protein and energy. They are especially important when using synthetic nitrogen-containing substances in feeding ruminants against the background of diets that are not sufficiently provided with sugar in the winter-stall period, and when feeding green conveyor feeds rich in protein in the summer [20].

Use of natural minerals makes it possible to dramatically reduce the number of growth-stimulating and therapeutic preparations used in meat production and to increase safety of animal husbandry products for humans.

The Institute of Microbiology and Virology has developed the «Bentobak» feed additive (C.C. No. 1684972) based on propionic acid bacteria *Propionibacterium shermanii*-15 and cellulolytic bacteria *Cellulomonas flavigena*-22, adsorbed on bentonite, which contributes to better absorption of coarse feed, normalisation of protein metabolism, reduction of acidosis risk in animals, increase of their productivity.

The test of the drug "Bentobak" on the sheep of the Kazakh thin-crowned breed showed that its introduction into the diet of animals at the rate of 1.5 g per one kg of body weight of the animal leads to a decrease in the composition of nitrogenous substances and an increase in the content of vitamin V_{12} in the scar content and in the chymus of the 12-ring intestine, a significant increase in the percentage of fiber digestibility. Under the influence of the test drug, the content of ammonia and urea in the blood decreases with a slight increase in volatile fatty acids. There was an increase in the reserve blood alkalinity. This fact is important, since with the depletion of alkaline reserves in the body, animals are prone to acidosis. The additional body weight gain was 120 g per day, resulting in approximately 100 days of fattening period body weight gain of 12 kg per sheep.

These facts indicate the high effectiveness of «Bentobak» and the prospects for its wide implementation in practice.

Strain *P. shermanii*-15 is replaced with *P. V12* to increase antagonistic activity of the preparation against intestinal infection agents, its content of probiotic bacteria cells and vitamin shermanii-C-8. Due to this, «Bentobak» feed additive contributes to better absorption of coarse feed, normalization of protein metabolism, reduction of acidosis risk in animals, increase of their productivity [21].

In connection with the above, the studies carried out are aimed at increasing the efficiency of the feed additive due to the use in its composition of a new strain of propionic acid bacteria with a wide range of biological activity, as well as at developing a technology for the production of the dry preparation «Bentobak» and its production tests on farm animals in peasant farms.

Materials and methods of research

The subject of the study was cellulolytic bacteria *Cellulomonas flavigena*-22, propionic acid bacteria *Propionibacterium shermanii* 15, *Propionibacterium shermanii* S-8. Strains of bacteria were grown on a nutrient medium used for co-cultivation of propionic acid and cellulolytic bacteria of the following composition (g/l): corn extract - 30.0; starch - 10.0; glucose - 10.0; KH_2PO_4 - 1.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5; KCL - 0.5; $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ - 2.5; CoCl_2 - 0.01; water - up to 1000 mL (pH 6.8-7.0).

Microbial enumeration was determined by a series of sequential dilutions in sterile tap water and sowing them into an agarised culture medium, followed by counting the grown colonies [22].

The quantitative content of vitamin V_{12} was determined by the microbiological method by the growth zones of the vitamin-dependent strain *E. coli* 133-3 and calculated from the Dmitrieva table.

Production tests of Bentobak were carried out at the Pchelka PLLC, from. Kh. Bizhanov Enbekshikazakh district of Almaty region, as well as in peasant farms «Nurbol-I» in the Zhanakorgan district, «Issamadin» in the Syrdarya district and the PLLC «Cheese Marzhany» in the Kazalinsky district by daily addition of the drug when fed into the total diet at the rate of 1.5 g per 1 kg of live weight of cattle.

Results and discussion

In order to expand biological activity of initial probiotic feed additive "Bentobak," strain *P. shermanii*-S-8 is introduced into its composition instead of *P. shermanii*-15.

For comparison, the original *P. shermanii*-15 strain and the new *P. shermanii*-S-8 were grown on a culture medium used to co-culture propionic acid and cellulolytic bacteria. Cultivation was carried out in a thermostat at 28-30°C temperature for 18-20 hours, then the bacterial titer and vitamin V_{12} content were determined in liquid cultures by inoculating appropriate dilutions on the solid culture medium of the above composition (Table 1).

Table 1 - Comparative performance characteristics of strains of propionic acid bacteria

Strain	pH	Acidity, °T	Titer, bn, CFU/mL	Vitamin V_{12} content, U/mg
<i>P. shermanii</i> 15	5,8	61,0	2,0	0,25
<i>P. shermanii</i> C-8	5,5	67,0	6,5	2,80

The results presented in Table 1 indicate that the *P. shermanii* strain S-8 exceeds *P. shermanii*-15 in the accumulation of bacterial cells by 3 times, vitamin V_{12} - by 11 times.

Strains of *Cellulomonas flavigene*-22, *P. shermanii* S-8 or *P. shermanii*-15 bacteria were used in the production of the dry feed additive.

Uterine broaching of bacterial strains was grown on nutrient medium in flasks in thermostat at 28-30°C temperature for 18-20 h. Flasks with 300 ml of nutrient medium were inoculated with cultures of cellulolytic and propionic acid bacteria from beveled agarised medium. Inoculum bacteria were grown in flasks in an amount of 1.5 L for 20 hours. The culture fluid of cellulolytic and propionic acid bacteria was produced in a 30 L fermenter without aeration at an excess pressure of 0.3-0.5 atm in the inoculum culture medium. The culture medium was prepared in a fermenter and sterilized at 121°C for 30 minutes. After cooling to 28°C, it was inoculated with five percent of cellulolytic bacteria inoculum and five percent of one of the strains of propionic acid bacteria. Bacteria cultivation was carried out in the following mode: culture temperature - 28-30°C; overpressure in the apparatus - 0.3-0.5 atm; cultivation time - 18-24 hours.

Bentonite (3%) and potassium chloride (0.1%) dissolved in drinking water were added to the fermentation culture liquid, the mixture was well stirred and allowed to cool for three hours. During this time, biomass was adsorbed on bentonite and precipitated. The supernatant was decanted and the remaining precipitate was centrifuged at 3000 rpm. Protective components were added to the centrifuged biomass of bacteria: glucose - 10%, sodium acetic acid - 0.5%, sodium citric acid - 0.5% and well mixed on a mechanical stirrer. Then the bacterial biomass was dried by a sublimation method in the following mode: freezing the product at 40°C for 6 hours; temperature of 10°C plates; temperature of additional drying of the product 20-25°C, underpressure 45 mA; duration of drying is 20-24 hours. In dry feed additives, viable cell content, vitamin V12 and cellulolytic activity were determined by plate method by Na-CMC hydrolysis zones.

The bacterial titer results are presented in Table 2.

Table 2 - Quality parameters of dry feed additives obtained by the sublimation method

Strain	Liquid culture titer mln. CFU/g	Paste titer, mln. CFU/g	Dry product titer, million CFU/g	
			PAB	CLB-22
CLB-22+PAB-C-8	500	6400	840	1600
CLB-22+PAB-C-15	520	2780	360	370

As can be seen from the presented table, the content of bacterial cells in liquid culture, bacterial paste and dry feed additive is higher in versions with strain *P. shermanii* S-8, wherein the proposed strain has stimulating effect on growth of cellulolytic bacteria.

Thus, an optimized probiotic feed additive «Bentobak» based on cellulolytic *Cellulomonas flavigene*-22 and propionic acid bacteria *Propionibacterim* has been developed. *shermanii* S-8 with increased biological activity. It exceeds the original content of probiotic bacteria and vitamin V12.

To study the safety of viable cells in a probiotic feed additive, 10 batches of the preparation based on cellulolytic and propionic acid bacteria adsorbed on bentonite, which are part of the feed additive, were produced under refrigeration conditions. These batches were placed in the refrigerator. The content of viable cells in the probiotic preparation during storage was determined by seeding from appropriate dilutions on dense culture media. The product was stored for one to twelve months (table 3).

Table 3 - Chart of storage of probiotic feed additive in the refrigerator

Viable cell content in the probiotic product after storage, million CFU/g						
Batch No.	initial	after 1 month	after 2 months	after 5 months	after 7 months	after 12 months
1	22,0±0,4	20,0±0,5	18,5±0,6	18,0±0,7	17,0±0,3	15,0±0,4
2	14,2±0,6	14,0±0,2	14,1±0,4	13,5±0,7	13,0±0,2	12,5±0,6
3	12,9±0,4	12,5±0,3	12,1±0,6	12,2±0,5	12,1±0,4	12,0±0,4
4	23,0±0,6	22,4±0,7	20,5±0,8	20,0±0,5	20,0±0,7	18,0±0,4
5	19,5±0,3	19,0±0,5	19,4±0,6	18,0±0,6	19,9±0,7	19,0±0,5
6	14,5±0,3	14,3±0,4	14,1±0,6	14,2±0,3	14,0±0,4	13,9±0,2
7	18,0±0,3	18,1±0,5	18,0±0,6	18,0±0,4	17,8±0,4	17,5±0,6
8	25,0±0,6	25,1±0,4	22,5±0,7	22,3±0,7	20,7±0,4	19,7±0,5
9	19,4±0,3	18,9±0,5	18,0±0,5	16,3±0,4	16,0±0,4	15,8±0,6
10	17,4±0,3	17,5±0,5	17,0±0,4	16,9±0,2	16,8±0,4	16,5±0,3

As can be seen from the presented table, the content of viable cells in the preparation remains stable and by 12 months of storage is $12.0 \pm 0,4$ - $19,7 \pm 0,5$ million. CFU/yr vs baseline - $12,9 \pm 0,4$ - $25,0 \pm 0,6$ million CFU/g.

Thus, the guaranteed retention time of viable bacterial cells in the feed additive is twelve months under refrigerated conditions.

Production tests of the optimized drug «Bentobak» when fattening cattle for 30 days were carried out in «Pchelka» LLP in the Enbekshikazakh district of Almaty region.

25 bulls from 12 months to 1.5 years of age were used in the experiment (tables 4, 5, 6).

Table 4 - Animal group

Animal type, age	Color	Inventory number	Weight, kg		Weight gain kg/day
			Prior to experience	After experience	
1	2	3	4	5	6
Goby, 1.0	White-headed	91322142	375	433	1,9
Goby, 1.0	Gray	60302914	256	296	1,3

Table continuation -4

1	2	3	4	5	6
Goby, 1.0	White-headed	90962784	345	398	1,7
Goby, 1.0	Black	60302912	250	302	1,7
Goby, 1.8	Brown	59922468	410	465	1,8
Goby, 1.0	Tiger	60302911	352	397	1,5
Goby, 1.0	White-headed-Black	60302732	287	330	1,4
Goby, 1.0	White-headed-red	60302731	350	408	1,9
Goby, 1.0	Black	6/Н	392	435	1,4
Goby, 1.0	White-headed	91322173	334	385	1,7
Average weight for 1 month			335,1	384,3	1,7

Table 5 - 2-group of animals

Animal type, age (year)	Color	Inventory number	Weight, kg		Weight gain kg/day
			Prior to experience	After experience	
1	2	3	4	5	6
Goby, 1.5	Brown	60302735	402	454	1,7
Goby, 1.5	White-headed	91121155	349	396	1,5
Goby, 1.2	Black and motley	60302730	330	378	1,6

Continuation of table 5

1	2	3	4	5	6
Goby, 1.2	Brown	60302913	248	285	1,2
Goby, 1.5	White-headed-black	91322150	395	440	1,5
Goby, 1.5	Black	60302916	363	400	1,2
Goby, 1.0	White-headed	90962785	340	373	1,1
Goby, 1.5	Black	60302917	393	440	1,6
Goby, 1.5	White-headed	91322128	350	400	1,7
Goby, 1.0	White-headed	91322129	380	425	1,5
Average weight for 1 month			355	399,9	1,4

Table 6 - Animal control group

Animal type, age	Color	Inventory number	Weight, kg		Weight gain kg/day
			Prior to experience	After experience	
Goby, 1.0	White-headed	91322135	346	361	0,5
Goby, 1.0	Brown	91322145	350	362	0,4
Goby, 1.0	Black	60302733	340	358	0,6
Goby, 1.0	White-headed	91322171	393	403	0,3
Goby, 1.0	White-headed	91322146	320	332	0,4
Average weight for 1 month			349,8	363,3	0,4

It was found that as a result of the use of the optimized drug «Bentobak» for 30 days, the average daily animal weight was on average 1400 g compared to 0.4 g of control animals that did not receive the biologics (Tables 6-8). It is also noted that the use of the drug «Bentobak» during feeding contributes to the improvement of the general physiological condition of animals, including nitrogen metabolism in the body, an increase in the degree of use of nutrients and their absorption. The introduction of the Bentobak feed additive into the animal diet accelerates the process of gaining live weight.

The optimized drug «Bentobak» was tested in cattle fattening in the farms of Kyzylorda region.

In the «Cheese Marzhany» LLP of the Kazalinsky district, the number of selected livestock for the experiment was 33 livestock with an average weight of 203 kg. The preparation was given daily along with food in an amount of 304.5 g per head. The duration of cattle fattening was 45 days. The total number of livestock in the drug-naïve control group was 46 heads with an average weight of 276 kg.

Test results are presented in Table 7.

Table 7 - Results of biologics use in «Cheese Marzhany» PLLC of Kazalinsky district

Option	Baseline mean weight of cattle, kg	Average weight after 45 days, kg	Additional weight added by biologics, kg
Experience	203	245,8	42,8
Control	276	297	21

It was found that when 33 cattle with supplementation with the biological drug Bentobac were fed for 45 days, the weight gain was 42.8 kg compared to 21 kg in the control group of animals.

In the same farm, studies were carried out on the use of the biological drug "Bentobak" by cattle (15 heads) of the Hungarian "Golshtin-Friz" breed, the weight of which averaged 194.13 kg. Animals were given 320 g of test drug per head daily for 90 days. According to the results of the study, feeding cattle with a biologics supplement for 90 days resulted in a weight gain of 112.5 kg per animal or 1200 g per day.

In the peasant farm «Nurbol-I» of the Zhanakorgan region, the experimental group contained 7 heads of cattle with an average weight of 180 kg. Age 1 year 5 months. The selected livestock received Bentobak biologics daily along with 270 g of feed per head for 60 days. According to the results of the study, the average live weight of cattle after 60 days was 231 kg, i.e., with the help of a biologics, the weight gain on average was 51 kg, which is 850 g per day per head.

In the same peasant farm, when fattening cattle with an average weight of 249 kg for 30 days, the daily supplement of «Bentobak» was 375 g per head. After the end of the experiment, the average live weight of cattle was 272 kg. With the help of a biologics, one animal gained 23 kg, which is 770g per day.

In the «Ysamaddin» peasant farm of the Syrdarya district, the experimental group contained 17 heads of cattle with an average weight of 225 kg. The preparation was added daily to feed in an amount of 337.5 g per head for 60 days. After fattening, the average weight of one animal was 296.4 kg. Therefore, with the help of a biologics, one livestock added 71.4 kg in weight, this is 1200 g per day.

It has been established that the additional livestock gain in farms depends on the duration of taking biologics and livestock breed.

Samples of cattle meat for chemical analyses were taken from peasant farms participating in the experiment.

Analysis of meat products was carried out in the Kyzylorda regional branch of the RSE "Republican Veterinary Laboratory" of the Committee for Veterinary Control and Supervision of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan.

The results of the chemical analysis of meat are shown in Table 8.

Table 8 - Chemical analysis of beef

The name of peasant farms	Organic and Leptic Parameters	pH (average)	Copper sulfate	Invasive diseases	Bakteriosco-Piya
Cheese Marzhany PLLC Kazalinsky district	In accordance with SS	5,98	Negative	Not detected	There is no growth
PE "Ysamaddin" Syrdarya district	In accordance with SS	5,9	Negative	Not detected	There is no growth
PE "Nurbol-I" Zhanakorgan district	In accordance with SS	5,96	Negative	Not detected	There is no growth

The results of the studies showed that the organoleptic parameters of cattle meat corresponded to SS 7269-79 (color, appearance, concentration, smell, etc.). Another sign of the suitability of meat is copper sulfate, which was absent in the test samples in accordance with SS 23392-78. It has been established that meat obtained from peasant farms does not contain microorganisms that cause diseases.

Thus, an optimized probiotic feed additive «Bentobak» based on cellulolytic bacteria *Cellulomonas flavigene*-22 and propionic acid bacteria *Propionibacterium shermanii* S-8 exceeding the initial one in antimicrobial activity, cellulolytic activity, vitamin V12 content, viable bacterial cells in liquid culture, bacterial paste and dry feed additive.

The Technological Instruction for the Production of Dry Biologics «Bentobak» has been developed. The guaranteed shelf life of the biologics according to the number of viable cells is 12 months under refrigerator conditions.

Production tests of the optimized drug «Bentobak», carried out in LLP «Pchelka», p. Kh. Bizhanov, Enbekshikazakh district, Almaty region, by adding it to the total diet at the rate of 1.5

g per 1 kg of live weight of cattle for 30 days, showed that the average daily animal weight was 1,400 g compared to 0.4 g of the control animal that did not receive the biologics.

Tests of the optimized drug «Bentobak» when fattening cattle in the farms of the Kyzylorda region showed that the additional livestock gain in farms is from 770 to 1200 g per head per day and depends on the duration of taking biologics and livestock breed.

Analysis of meat products taken from peasant farms participating in the experiment showed that all of them corresponded to organoleptic, chemical and microbiological indicators of cattle meat according to SS 7269-79.

Another sign of the suitability of meat is the absence of copper sulfate in it in accordance with SS 23392-78. Meat obtained from peasant farms did not contain microorganisms that cause diseases.

References:

- 1 All about animal husbandry. Theory and practice, 2016. - URL: "<http://worldgonesour.ru/osnovy-zhivotnovodstva>"zhivotnovodstva HYPERLINK.
- 2 Popova S. The role of mineral elements and vitamins in the nutrition of cattle, 2016. - URL: "<http://agropost.ru/>"ru. HYPERLINK.
- 33 Amino acids, 2014. - URL: "<http://worldgonesour.ru/korma/222-aminokisloty.html>" HYPERLINK.
- 4 Koschaev A.G., Nikolaenko S.N., Chistousova M.S. Technology of vitamin feed additive production from canning industry waste//Collection of scientific works by Sworld. - Odessa, 2008. - T. 21. - № 1. - S.25-27.
- 5 Koschaev A.G., Petenko A.I., A.3 Husid S.B., Volkova S.A., Donskov Y.P. Development of a feed additive based on bentonite and rice processing waste//Young scientist. - 2015. - № 1. - S.135-138.
- 6 Zholobova I.S., Luneva A.V., Lysenko Yu.A. Effect of sodium hypochlorite on quail during the period of intensive oviposition//Poultry farming. - 2013. - № 07. - S.15-20.
- 7 Koschaev A.G., Koschaeva O.V., Nikolaenko S.N., Kharchenko V.I. Features of the technology of obtaining coagulates from alfalfa juice//Politematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University. - 2014. - № 95. - S.720-728.
- 8 Production method of protein-vitamin additive. Koschaev A.G., Badyakina A.O., Plutakhin G.A., Petenko A.I., Pankov A.A., Pankov S.A. Patent for the invention RU 2197096 28.03.2000.
- 9 Patent for the invention of the Russian Federation No. 2266680. Method for production of protein fodder additive from plant raw materials and device for its implementation/A.G. Koschaev, G.A. Plutakhin, A.I. Petenko - Opubl. 12.04.2004.
- 10 Pat. RF, NO. 2038800. Biological preparation "RIAL" and the method of feeding animals, birds and bees/Zharkova G.Yu., Makarov N.V., Ryabinina L.Yu. - Publ. 09.07.1995.
- 11 Pat. RF NO. 2422043. Selenium-containing drug for animal husbandry/Zlotnikov KM, Zlotnikov AK, Zlotnikova IK - publ. 27.06.2011.
- 12 Begner H, Ketz A. Scientific fundamentals of farm animal nutrition. - M.: Kolos, 2010.
- 13 Koschaev A.G., Nikolaenko S.N., Fisenko G.V., Sahakyan A.V. Physical and biochemical substantiation of application of Bacell bacterial additive as part of vegetable feed on poultry//Collection of scientific works of the All-Russian Research Institute of Sheep and Goat Breeding. - 2009. - T. 2. - № 2-2. - S.140-143.
- 14 Probiotic feed supplement, 2020. - URL: "https://agrovektor.ru/physical_product/259034-probioticheskaya-kormovaya%20dobavka-dlya-krupnogo-rogatogo-skota-laktobifadol-forte.html" HYPERLINK.
- 15 Anadyn A., Martınez-Larranaga M.R., Aranzazu-Martınez M. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and Safety Assessment. Regulatory Toxicology // Pharmacology. - 2006. - Vol. 12. - P.91-95.
- 16 Gaiduk AG, Khaziakhmetov F.S. Probiotic Vitafort in the diet of ducklings//Poultry farming. - 2011. - № 12. - S.27.
- 17 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Test of therapeutic and preventive effectiveness of probiotic // Abstr. of International Conference «Probiotics and Prebiotics». - Koshica, Slavenia, 2011. - P.87.

18 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A., Melnikov V.G. Probiotic Lactovit-K for fighting against coccidiosis infectious-invasive diseases of poultry and diseases of honey bees // Abstr. of XXXIV of the Society for Microbial Ecology and Disease. - Yokohama, Japan, 2011. - P. 33.

19 Bobrovskaya I.V., Nemineschaya L.A., Eremets N.K., Provotorova O.V., Likhasterstova S.V., Eremets V.I., Samuylenko A.Ya. Biotechnology of new probiotics and synbiotic complexes for farm animals and poultry//Biotechnology: reality and perspectives in agriculture: mat Intern. scientific-practical. conf. - Saratov, 2013. - S.8-10.

20 Petenko A.I., Lysenko Yu.A. Feed additives in quail rations//Poultry farming. - 2012. - № 9. - S.36-38.

21 Patent RK No. 311262. Method for production of fodder additive Bentobak//Sadanov A.K., Gavrilova N.N., Shorabaev E.Zh. - Bulletin No. 6 of 15.06.2016. - 7 s.

22 Egorov N.S. Fundamentals of the doctrine of antibiotics. - M.: Publishing House of Moscow State University, 1994. - 512 s.

МРНТИ 34.27.17

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы,
Казахстан

² Институт микробиологии национальной академии наук Азербайджана, Баку,
Азербайджан

*e-mail.ru: iesmirnova@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КУЛЬТУРЫ СОИ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.03

Аннотация

Важной проблем аграрного сектора, требующей решения, является дефицит белка в питании людей и недостаточность кормовой базы для животноводства. Для решения этих задач необходимо увеличение производства высокобелковых бобовых культур и, прежде всего, сои. Для повышения урожайности сои применяют клубеньковые бактерии. Эти бактерии являются симбионтами, –поставляющими растениям биологический азот, и тем самым, улучшая их азотное питание. Целью данного исследования было выделение клубеньковых бактерий, получение чистых культур, изучение их основных биологических свойств, отбор наиболее активных штаммов, перспективных для выращивания культуры сои. Из клубеньков растений сои, собранных на полях Алматинской области Казахстана, было выделено 24 чистые культуры бактерий. Проведено изучение их основных культурально-морфологических и биохимических свойств, исследована нодулирующая и азотфиксирующая способности. В результате отобрано четыре высокоэффективных штамма клубеньковых бактерий, перспективных для выращивания культуры сои.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, соя, нодуляция, азотфиксация, высокоэффективные штаммы

Важной проблемой аграрного сектора является дефицит белка в питании людей и недостаточность кормовой базы для животноводства. Для решения этих задач необходимо увеличение производства высокобелковых зернобобовых культур и, прежде всего, сои [1]. Высокое содержание в зерне сои белка (до 45-48%) и масла (до 25 %) определяют её широкое применение [2-4]. Однако урожайность сои в Казахстане по сравнению с другими странами низкая. Так, если средняя урожайность сои в Бразилии и США составляет 3,3 т/га, в Канаде - 2,6 т/га, то в России - 1,4-1,6 т/га, а в Казахстане - не

превышает 1,1-1,2 т/га [5]. Исходя из этого, поиск путей повышения урожайности этой культуры является весьма актуальным.

Для повышения урожайности сои применяются минеральные и биологические удобрения, но упор делается на биоудобрения. В состав биологических удобрений, как правило, входят симбиотические азотфиксирующие бактерии. Эти бактерии обитают в клубеньках на корнях сои, способны извлекать азот из воздуха и преобразуют его в форму, которую могут использовать растения. Одной из проблем низкой урожайности сои в Казахстане является то, что для повышения урожайности сои применяют, в основном, биопрепараты импортного происхождения, которые часто оказываются малоэффективными. Это обусловлено их низкой приживаемостью на корнях сои и не приспособленностью к почвенно-климатическим условиям. Целью данного исследования было выделение клубеньковых бактерий, получение чистых культур, изучение их основных биологических свойств, отбор наиболее активных штаммов, перспективных для выращивания культуры сои.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили бактерии, выделенные из клубеньков на корнях растений сои (*Glycine max* (L.) Merr.), собранных в Алматинской области Казахстана - основном регионе выращивания сои. Для выделения ризобий были отобраны здоровые и мощные растения сои с хорошо развитой коневой системой и многочисленными клубеньками на корнях. От корня пинцетом отделяли крупные, розовые клубеньки и переносили в чашку Петри, где их разрезали скальпелем на части. Для выделения клубеньковых бактерий использовали питательную среду Мазе следующего состава, г/л: K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4$ - 0,3; сахароза - 10,0; отвар из 100 г гороха, pH 6,8-7,0. Небольшое количество содержимого клубенька переносили в 100 мкл стерильной воды, затем - на поверхность агаризованной среды Мазе в чашке Петри, размазывали шпателем и инкубировали при 25°C.

Для изучения способности образовывать клубеньки на корнях сои (нодуляция) бактерии выращивали на жидкой питательной среде Мазе при 180 об/мин, 28°C в течение 5 суток. В опытах использовали сою сорта «Эврика». Перед посевом семена обрабатывали суспензией бактерий с титром клеток 1×10^8 кл/мл в течение двух часов при комнатной температуре [6]. Затем семена высевали в вегетационные сосуды объемом 500 мл (три растения на сосуд). Для питания проростков применяли стерильный раствор Кноппа следующего состава, г/л: $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ - 1,0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,25, KH_2PO_4 - 0,25, KCl - 0,12, $FeCl_3 \times 6H_2O$ - 0,004, вода - 1000 мл. Все эксперименты были выполнены в пяти повторностях. Подсчет количества и средней массы клубеньков проводили после 30-и дней выращивания.

Нитрогеназную активность бактерий определяли ацетиленовым методом на газовом хроматографе “Agilent Technology 7890 B” (США) с пламенно-ионизационным детектором [7,8].

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства ризобий изучали по стандартным методикам [9].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [10].

Результаты и обсуждение

Выделение бактерий проводили из клубеньков на корнях сои, собранной на полях Алматинской области Казахстана. Для выделения ризобий были отобраны растения с хорошо развитой корневой системой и большим числом клубеньков на корнях. В общей сложности было собрано 67 растений сои.

В лабораторных условиях из клубеньков на корнях сои было проведено выделение ризобий на питательной агаризованной среде Мазе. Засеянные чашки Петри инкубировали в термостате при 25°C. Появление колоний на 1-2-е сутки свидетельствовало о загрязнении культуры. Быстрорастущие ризобии появлялись на 3-4, медленно растущие - на 7-9 сутки (рисунок 1).

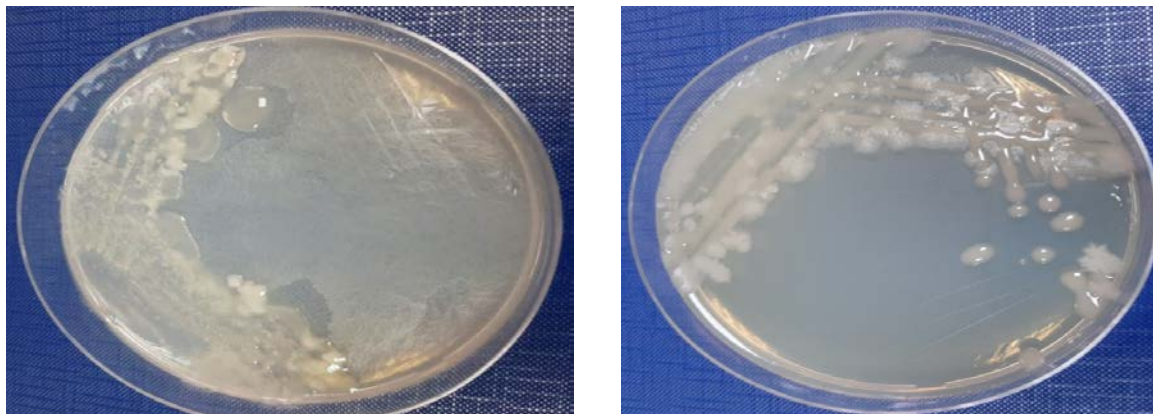


Рисунок 1 - Выделение клубеньковых бактерий на агаризованной среде Мазе

Чистоту культур клубеньковых бактерий проверяли визуально и под микроскопом. Микроскопический контроль проводился с препаратами живых и фиксированных окрашенных клеток с помощью светового микроскопа. В результате проведенной работы было выделено 24 чистые культуры клубеньковых бактерий.

Исследование культурально-морфологических свойств бактерий показало, что при росте на питательной среде Мазе бактерии образовывали бесцветные или молочно-белые слизистые колонии. Исследование морфологии ризобий показало, что все выделенные культуры были грамотрицательные, не образовывали спор и имели палочковидную форму клеток. При просмотре под микроскопом препаратов живых клеток бактерий отмечали их высокую подвижность. Установлено, что клетки бактерий мелкие, полиморфные и с течением времени принимают округлую форму. На фиксированных окрашенных препаратах четко просматривалась зернистость внутреннего содержания клеток клубеньковых бактерий.

Исследование основных физиолого-биохимических свойств бактерий показало, что выделенные бактерии относятся к аэробам, не растут на мясопептонных средах и других белковых субстратах животного происхождения, рост на безазотистой среде Эшби слабый. Установлено, что штаммы бактерий слабо утилизируют сахара, желатину не разжижают и крахмал не разлагают. По основным культурально-морфологическим и биохимическим свойствам бактерии отнесены к двум родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*.

Известно, что не все клубеньковые бактерии способны образовывать клубеньки на корнях растений сои. В этой связи, было проведено изучение способности выделенных бактерий к нодуляции и фиксации азота воздуха. Наличие этих свойств у бактерий является основанием для их дальнейшего использования при разработке биоудобрения для культуры сои. В таблице представлены результаты семи штаммов, показавших наиболее высокие результаты.

Таблица - Нодулирующая способность и нитрогеназная активность штаммов ризобий

Штаммы	Количество клубеньков на растение, шт.	Сухой вес клубеньков, мг/растение	Нитрогеназная активность, $\mu\text{моль C}_2\text{H}_4/\text{мл/ч}$
Контроль	0	0	-
МА-1	12,8 $\pm$ 0,1	128,3 $\pm$ 1,3	3,87 $\pm$ 0,02
Н-2	14,6 $\pm$ 0,2	130,2 $\pm$ 1,2	2,32 $\pm$ 0,01
Н-3	12,1 $\pm$ 0,1	142,2 $\pm$ 1,0	5,25 $\pm$ 0,02
Н-4	17,8 $\pm$ 0,2	147,5 $\pm$ 1,2	6,65 $\pm$ 0,01
Н-6	18,2 $\pm$ 0,2	153,2 $\pm$ 2,2	6,71 $\pm$ 0,01
Н-7	18,4 $\pm$ 0,1	158,5 $\pm$ 2,1	6,74 $\pm$ 0,01
Н-8	17,3 $\pm$ 0,1	148,4 $\pm$ 2,0	6,34 $\pm$ 0,02
Примечание: $p < 0,05$			

Из данных таблицы следует, что штаммы ризобий активно образовывали клубеньки на корнях сои и фиксировали азот воздуха. Отмечено, что во всех вариантах опыта клубеньки были розовыми, что свидетельствует об активной фиксации азота атмосферы, так как розовый цвет клубеньков свидетельствует о наличии леггемоглобина, который контролирует поток кислорода к бактериям. Также показано, что по истечении 30 суток роста сои в вариантах со штаммами МА-1, Н-2, Н-3 количество клубеньков на одно растение составляло 12-14 штук, а в вариантах со штаммами Н-4, Н-6, Н-7, Н-8 оно было большим и в среднем составляло 17-18 штук на растение. Отмечено, что в этих вариантах клубеньки были более крупными и темно-розовыми. Появление клубеньков в этих вариантах было на 12,5% раньше, чем в вариантах со штаммами МА-1, Н-2, Н-3. Также установлено, что азотфиксирующая активность менялась в зависимости от штамма бактерий. Показано, что азотфиксирующая активность штаммов Н-4, Н-6, Н-7, Н-8 была выше, чем у штаммов МА-1, Н-2, Н-3 (таблица 1).

Заключение

Таким образом, проведено выделение бактерий из клубеньков растений сои, собранных на полях Алматинской области Казахстана. Для выделения бактерий было собрано 67 растений сои с хорошо развитой корневой системой и большим числом клубеньков на корнях. В лабораторных условиях из клубеньков сои на питательной среде Мазе были выделены бактерии, проведена их очистка и получены 24 чистые культуры. Изучены их основные культурально-морфологические и биохимические свойства и показано, что бактерии относятся к двум родам *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*. Проведено исследование способности штаммов бактерий образовывать клубеньки на корнях сои и изучена их азотфиксирующая активность. По результатам исследований отобрано четыре наиболее активных штамма бактерий (Н-4, Н-6, Н-7 и Н-8). Установлено, что в вариантах опытов с этими штаммами, клубеньки на корнях сои были более крупными и темно-розовыми, что свидетельствует о высоком содержании леггемоглобина, который контролирует приток кислорода к бактериям. Также отмечено, что появление клубеньков на корнях сои в этих вариантах было на 12,5% раньше, чем в других вариантах. Таким образом, отобрано четыре высокоэффективных штамма клубеньковых бактерий, перспективных для создания биоудобрения для выращивания культуры сои.

Выделенные штаммы бактерий адаптированы к почвенно-климатическим условиям юго-восточного региона Казахстана и обладают высокой приживаемостью на корнях

местных сортов сои, что позволит при использовании биоудобрения избежать конкуренции с почвенной микрофлорой.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP09259080.

Литература:

- 1 Gaweda D., Nowak A., Haliniarz M., Woźniak A. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems // International journal of plant production. 2020. vol. 14. P. 475-485. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00098-1>.
- 2 Wijewardana C, Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. Food Chemistry. 2019. vol. 278. P. 92-100. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.035.
- 3 Guan X., Zhong X., Lu Y., Du X., Jia R., Li H., Zhang M. Changes of soybean protein during tofu processing. Foods. 2021. Vol. 10. P. 1594. <https://doi.org/10.3390/foods10071594>.
- 4 de Waroux Y.P, Garrett R.D., Graesser J., Nolte C., White C, Lambinad E.F. The restructuring of South American soy and beef production and trade under changing environmental regulations. World Development. 2019. vol. 121. P. 188-202. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2017.05.034>.
- 5 Global Market Analysis, FAS, USDA. World Agricultural Production. Washington: FAS, 2021. 42 p. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production>.
- 6 Ying Liu, Xiaopeng Li, Xiaohao Li, Kaizhe Liu, Gangshun Rao, Yingbin Xue. Optimization of aseptic germination system of seeds in soybean (*Glycine max* L.). Journal of Physics. 2020. ID 1637. e012077. doi: 10.1088/1742-6596/1637/1/012077.
- 7 Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. Methods X. 2018. Vol. 5. P. 909-914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- 8 Kaushal M., Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. Indian Journal of Biotechnology. 2015. Vol. 14. P. 221-227.
- 9 Ившина И.Б. Большой практикум «Микробиология». СПб.: Проспект Науки, 2019. 112 с.
- 10 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Hotline-Telecom, 2016. 288 с.

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ «Микробиология и вирусология ғылыми-зерттеу орталығы» ЖШС, Алматы, Қазақстан

² Әзербайжан Ұлттық ғылым академиясының Микробиология институты, Баку,
Әзірбайжан

* e-mail.ru: iesmirnova@mail.ru

СОЯ ДАҚЫЛДАРЫН ПЕРСПЕКТИВТІ ӨСІРУ ҮШІН ТҮЙНЕК БАКТЕРИЯЛАРДЫ БӨЛІП АЛУ

Түйін

Аграрлық сектордың шешуді қажет ететін маңызды мәселесі – адам тамақтанатын ақуыздың жетіспеуі және малға жем-шөптің тапшылығы. Бұл мәселелерді шешу үшін ақуызы жоғары бұршақ дақылдарын және ең алдымен соя дақылдарын өндіруді арттыру қажет. Сояны өсіру кезінде оның өнімін арттыру үшін түйнек бактериялар қолданылады. Бұл бактериялар симбионттар болып табылады, олар өсімдіктерді биологиялық азотпен қамтамасыз етеді және сол арқылы олардың азотпен қоректенуін жақсартады. Бұл зерттеудің мақсаты түйінді бактерияларды бөліп алу, таза дақылдарды алу, олардың негізгі биологиялық қасиеттерін зерттеу және соя өсіруге перспективті ең белсенді штамдарды таңдау болды. Қазақстанның Алматы облысының егіс алқаптарынан жиналған соя өсімдіктерінің түйіндерінен бактериялардың 24 таза штамдары бөлініп алынды. Олардың негізгі культуралық-морфологиялық және биохимиялық қасиеттері

зерттелді, олардың нодулдік және азотты бекіту қабілеттері зерттелді. Нәтижесінде соя өсіру үшін перспективті төрт тиімділігі жоғары түйнек бактерия штамдары таңдалды.

Кілтті сөздер: түйнек бактериялар, соя, нодуляция, азотфиксация, тиімділігі жоғары штамдар.

IRSTI 34.27.17

I.E. SMIRNOVA^{1*}, Sh.A. BABAEVA², E.R. FAYZULINA¹, L.G. TATARKINA¹,
G.A. SPANKULOV¹

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

² Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

*e-mail.ru: iesmirnova@mail.ru

ISOLATION OF RHIZOBIA, PROMISING FOR SOYBEAN PRODUCTIVITY

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.03

Summary

An important problem of the agricultural sector that needs to be addressed is the lack of protein in human nutrition and fodder for livestock. To solve these problems, it is necessary to increase the production of high-protein legumes and, above all, soybeans. When growing soybeans, nodule bacteria are used to increase its yield. These bacteria are symbionts, they fix nitrogen, and thus improve the nitrogen nutrition of plants. The purpose of this study was to isolate rhizobia, obtain pure cultures, study their basic biological properties, and select the most active strains that are promising for soybean cultivation. From nodules of soybean plants collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan, 24 pure cultures of rhizobia were isolated. Their basic cultural-morphological and biochemical properties were studied, their nodulation and nitrogen-fixing abilities were studied. As a result, four highly effective strains of rhizobia were selected that are promising for growing soybeans.

Keywords: rhizobia, soybean, nodulation, nitrogen fixation, highly effective strains.

An important problem of the agricultural sector is the lack of protein in human nutrition and the lack of fodder for livestock. To solve these problems, it is necessary to increase the production of high-protein leguminous crops and, above all, soybeans [1]. The high content of protein (up to 45-48%) and oil (up to 25%) in soybean grain determines its widespread use [2-4]. However, soybean yields in Kazakhstan are low compared to other countries. So, if the average soybean yield in Brazil and the USA is 3.3 t/ha, in Canada - 2.6 t/ha, in Russia - 1.4-1.6 t/g, and in Kazakhstan - does not exceed 1 .1-1.2 t/ha [5]. At the same time, soybean grain is characterized by low quality indicators. Based on this, the search for ways to increase the yield of this crop is very relevant.

To increase the yield of soybeans, mineral and biological fertilizers are used, but the emphasis is on biofertilizers. The composition of biological fertilizers, as a rule, includes symbiotic nitrogen-fixing bacteria. These bacteria live in soybean root nodules and are able to extract nitrogen from the air and convert it into a form that plants can use. One of the problems of low soybean yields in Kazakhstan is that to increase soybean yields, mainly biological preparations of imported origin are used, which often turn out to be ineffective. This is due to their low survival rate on soybean roots and their inability to adapt to soil and climatic conditions. The purpose of this study was to isolate nodule bacteria, obtain pure cultures, study their basic biological properties, and select the most active strains that are promising for growing soybeans.

Materials and methods of research

The objects of the study were bacteria isolated from nodules on the roots of soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.), collected in the Almaty region of Kazakhstan - the main region

of soybean cultivation. For the isolation of rhizobia, healthy and powerful soybean plants with a well-developed root system and numerous nodules on the roots were selected. Large, pink nodules were separated from the root with tweezers and transferred to a Petri dish, where they were cut into pieces with a scalpel. To isolate nodule bacteria, a Maze nutrient medium was used, with the following composition, g/l: K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4$ - 0,3; sucrose - 10,0; decoction of 100 g of peas, pH 6,8-7,0. A small amount of nodule content was transferred into 100 μ l of sterile water, then onto the surface of Maze agar medium in a Petri dish, smeared with a spatula, and incubated at 25°C.

To study the ability to form nodules on soybean roots (nodulation), bacteria were grown on liquid Maze medium at 180 rpm, 28°C for 5 days. In the experiments, we used soybeans of the Evrika variety. Before sowing, the seeds were treated with a suspension of bacteria with a cell titer of 1×10^8 cells/ml for two hours at room temperature [6]. Then they were sown in 500 ml vegetation vessels (three plants per vessel). To feed the seedlings, a sterile Knopp solution was used, with the following composition, g/l: $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ - 1,0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0.25, KH_2PO_4 - 0.25, KCl - 0.12, $FeCl_3 \times 6 H_2O$ - 0.004, water - 1000 ml. All experiments were performed in five repetitions. The number and average weight of nodules were counted after 30 days of cultivation.

The nitrogenase activity of bacteria was determined by the acetylene method on an Agilent Technology 7890 B gas chromatograph (USA) with a flame ionization detector [7,8].

The cultural-morphological and physiological-biochemical properties of rhizobia were studied according to standard methods [9].

Statistical processing of the results was carried out using the STATISTICA 10.0 software package [10].

Research results and discussion

Bacteria were isolated from nodules on soybean roots collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan. For the isolation of rhizobia, plants with a well-developed root system and a large number of nodules on the roots were selected. A total of 67 soybean plants were collected.

Under laboratory conditions, rhizobia were isolated from nodules on soybean roots on a nutrient agar medium Maze. The seeded Petri dishes were incubated in a thermostat at 25°C. The appearance of colonies on the 1st-2nd day testified to the contamination of the culture. Fast-growing rhizobia appeared on days 3-4, slow-growing ones - on days 7-9 (Figure 1).

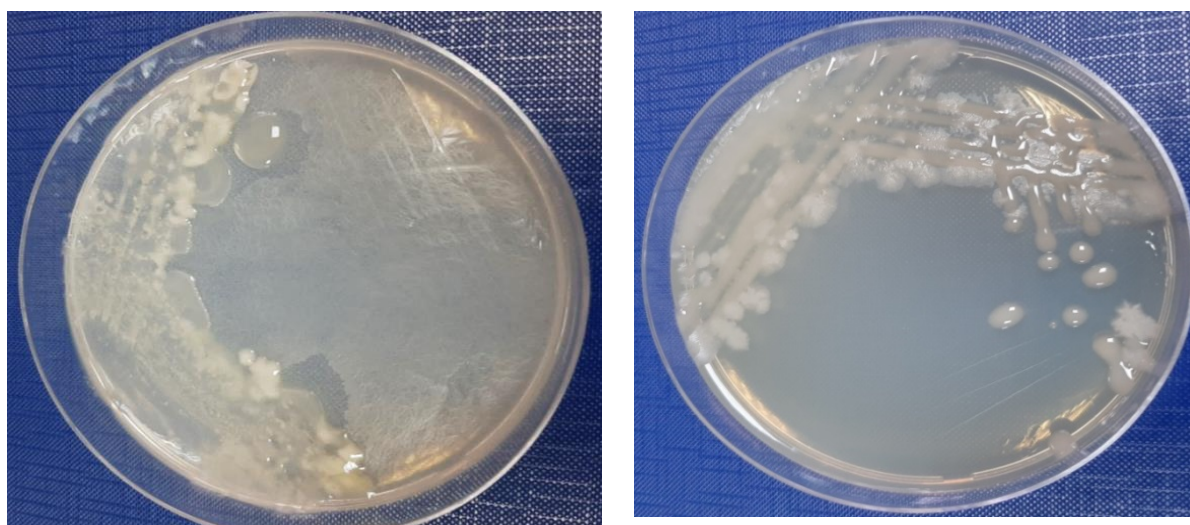


Figure 1 - Isolation of nodule bacteria on Maze agar medium

The purity of nodule bacteria cultures was checked visually and under a microscope. Microscopic control was carried out with preparations of live and fixed stained cells using a light microscope. As a result of the work carried out, 24 pure cultures of nodule bacteria were isolated.

The study of the cultural and morphological properties of bacteria showed that when growing on Maze's medium, the bacteria formed colorless or milky-white mucous colonies. A study of the morphology of rhizobia showed that all isolated cultures were gram-negative, did not form spores, and had a rod-shaped cell shape. When viewing preparations of living bacterial cells under a microscope, their high mobility was noted. It was found that bacterial cells were small, polymorphic, and over time the cells took on a rounded shape. On fixed stained preparations, the granularity of the internal content of nodule bacteria cells was clearly visible.

The study of the basic physiological and biochemical properties of bacteria showed that the isolated bacteria belong to aerobes, do not grow on meat-peptone media and other protein substrates of animal origin, growth on a nitrogen-free Ashby medium is weak. It has been established that bacterial strains poorly utilize sugars, do not liquefy gelatin, and do not decompose starch. According to the main cultural, morphological and biochemical properties, the bacteria were assigned to two genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*.

It is known that not all nodule bacteria are able to form nodules on the roots of soybean plants. In this regard, the ability of isolated bacteria to nodulation and fix air nitrogen was studied. The presence of these properties in bacteria is the basis for their further use in the development of biofertilizers for soybeans. Table presents the results of the seven strains that showed the highest results.

Table - Nodulation and nitrogenase activity of rhizobia strains

Strains	Number of nodules per plant, pcs.	Nodule dry weight, mg/plant	Nitrogenase activity, $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{ml/h}$
Control	0	0	-
MA-1	12,8 $\pm$ 0,1	128,3 $\pm$ 1,3	3,87 $\pm$ 0,02
H-2	14,6 $\pm$ 0,2	130,2 $\pm$ 1,2	2,32 $\pm$ 0,01
H-3	12,1 $\pm$ 0,1	142,2 $\pm$ 1,0	5,25 $\pm$ 0,02
H-4	17,8 $\pm$ 0,2	147,5 $\pm$ 1,2	6,65 $\pm$ 0,01
H-6	18,2 $\pm$ 0,2	153,2 $\pm$ 2,2	6,71 $\pm$ 0,01
H-7	18,4 $\pm$ 0,1	158,5 $\pm$ 2,1	6,74 $\pm$ 0,01
H-8	17,3 $\pm$ 0,1	148,4 $\pm$ 2,0	6,34 $\pm$ 0,02
Note: $p < 0,05$			

Cont.

It follows from the data in Table 1 that rhizobia strains actively formed nodules on soybean roots and fixed air nitrogen. It was noted that in all variants of the experiment, the nodules were pink, which indicates the active fixation of atmospheric nitrogen, since the pink color of the nodules indicates the presence of leghemoglobin, which controls the oxygen flow to the bacteria. It was also shown that after 30 days of soybean growth, in variants with strains MA-1, H-2, H-3, the number of nodules per plant was 12-14 pieces, and in variants with strains H-4, H-6, H-7, H-8 it was large and averaged 17-18 pieces per plant. It was noted that in these variants the nodules were larger and dark pink, and the appearance of nodules in these variants was 12.5% earlier than in the variants with strains MA-1, H-2, H-3. Also, it was found that

nitrogen-fixing activity varied depending on the bacterial strain. It was shown that the nitrogen-fixing activity of strains H-4, H-6, H-7, H-8 was higher than that of strains MA-1, H-2, H-3 (table 1).

Conclusion

Thus, rhizobia were isolated from nodules of soybean plants collected in the fields of the Almaty region of Kazakhstan. To isolate bacteria, 67 soybean plants with a well-developed root system and a large number of root nodules were collected. Under laboratory conditions, bacteria were isolated from soybean nodules on the Maze medium, they were purified, and 24 pure cultures were obtained. Their main cultural, morphological and biochemical properties have been studied and it has been shown that the bacteria belong to two genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. The ability of bacterial strains to form nodules on soybean roots was studied and their nitrogen-fixing activity was studied. According to the research results, four most active strains of bacteria (H-4, H-6, H-7 and H-8) were selected. It was found that in the variants of experiments with these strains, nodules on soybean roots were larger and dark pink, which indicates a high content of leghemoglobin, which controls the flow of oxygen to bacteria. It was also noted that the appearance of nodules on soybean roots in these variants was 12.5% earlier than in other variants. Thus, four highly effective strains of nodule bacteria were selected that are promising for growing soybeans.

Based on these strains, it is possible to create a biofertilizer. The isolated bacterial strains are adapted to the soil and climatic conditions of the southeastern region of Kazakhstan, and their use will allow avoiding competition with soil microflora. Also, the selected strains have a high survival rate on the roots of local soybean varieties.

The study was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the framework of the grant project AP09259080.

References:

- 1 Gaweda D., Nowak A., Haliniarz M., Woźniak A. Yield and economic effectiveness of soybean grown under different cropping systems // International journal of plant production. 2020. vol. 14. P. 475-485. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00098-1>.
- 2 Wijewardana C, Reddy K.R., Bellaloui N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. Food Chemistry. 2019. vol. 278. P. 92-100. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.035.
- 3 Guan X., Zhong X., Lu Y., Du X., Jia R., Li H., Zhang M. Changes of soybean protein during tofu processing. Foods. 2021. Vol. 10. P. 1594. <https://doi.org/10.3390/foods10071594>.
- 4 de Waroux Y.P, Garrett R.D., Graesser J., Nolte C., White C, Lambinad E.F. The restructuring of South American soy and beef production and trade under changing environmental regulations. World Development. 2019. vol. 121. P. 188-202. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2017.05.034>.
- 5 Global Market Analysis, FAS, USDA. World Agricultural Production. Washington: FAS, 2021. 42 p. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production>.
- 6 Ying Liu, Xiaopeng Li, Xiaohao Li, Kaizhe Liu, Gangshun Rao, Yingbin Xue. Optimization of aseptic germination system of seeds in soybean (*Glycine max* L.). Journal of Physics. 2020. ID 1637. e012077. doi: 10.1088/1742-6596/1637/1/012077.
- 7 Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. Methods X. 2018. Vol. 5. P. 909-914. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.010.
- 8 Kaushal M., Kaushal R. Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. Indian Journal of Biotechnology. 2015. Vol. 14. R. 221-227.
- 9 Ivshina I.B. Bol'shoj praktikum «Mikrobiologiya». SPb.: Prospekt Nauki, 2019. 112 s.

10 Borovikov V.P. Populyarnoe vvedenie v sovremennyy analiz dannyh v sisteme STATISTICA. М.: Hotline-Telecom, 2016. 288 с.

МРНТИ: 34.25.29; 34.25.39

А.И. КЫДЫРМАНОВ¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹,
С.А. СУЛЕЙМЕНОВА^{1*}, С. ГУДМАН²

¹ТОО «Научно производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан.

²Институт общей и сравнительной биологии, Университет Лидса, Лидс, Великобритания
*e-mail: suleymenova.87@inbox.ru

ГЕРПЕСВИРУСЫ КАСПИЙСКИХ ТЮЛЕНЕЙ (PUSA CASPICA)

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.04

Аннотация

В статье приводятся сведения о вирусологическом и серологическом скрининге герпесвирусов в популяции каспийских тюленей. Показана устойчивая циркуляция герпесвирусов тюленей первого типа (PhHV-1) среди каспийских тюленей. Отмечено, что PhHV-1 является эндемичным для каспийских тюленей и, возможно, вызывает постоянную вирусную нагрузку на здоровье тюленей, которая усугубляется провоцирующими факторами.

Ключевые слова: герпесвирусы тюленей, каспийский тюлень, полимеразная цепная реакция, серология, α -герпесвирус.

В последние годы, благодаря широкомасштабным исследованиям с использованием современных методов молекулярной диагностики, был идентифицирован ряд вирусов, инфицирующих морских млекопитающих.

В настоящее время от тюленей изолированы семь видов герпесвирусов (PhHV-1 – PhHV-7), относящихся к родам альфа- и гамма-герпесвирусов [1, 2, 3, 4, 5, 6]. В инфекционной патологии этих животных наиболее актуальным является герпесвирус тюленей 1 [Phocid Herpesvirus type 1] (PhHV-1) из рода α -герпесвирусов. Инфекция, вызванная этим вирусом у обыкновенных (*Phoca vitulina*) и серых (*Halichoerus grypus*) тюленей, характеризуется респираторными проявлениями с интерстициальной пневмонией и коагулятивным некрозом тканей надпочечников и печени [1, 7]. Остальные шесть герпесвирусов (PhHV-2 – PhHV-7) относятся к роду γ - герпесвирусы, из них PhHV-4 и PhHV-7 имеют диагностическую значимость при воспалениях и язвенных поражениях мягких тканей ротовой полости тюленей. Герпесвирус PhHV-6 у тюленей ассоциирует с заболеванием глаз [5]. Роль вирусов PhHV-2, PhHV-3 и PhHV-5 в инфекционной патологии тюленей остается неизвестной.

С целью установления круга вирусных патогенов, поражающих каспийских тюленей, нами проведен вирусологический скрининг биоматериалов на наличия герпесвирусов.

Материалы и методы

Исследование 188 образцов от 47 особей каспийских тюленей, собранных в казахстанской части Каспийского моря в 2016–2017 гг., проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Биологические образцы собраны весной и осенью на участках лежбищ в северо-восточной части моря от животных, отловленных для спутниковой телеметрии.

С праймерами к gD и UL52 генам герпесвирусов проведен ПЦР скрининг материалов на присутствие ДНК α - и γ -герпесвирусов тюленей (PhHV-1 и PhHV-2, соответственно). В качестве положительного контроля использовали штамм PhHV-1, полученный из Европейского архива вирусных антигенов – EVAg.

Образцы сывороток, собранных с 2007 по 2017 гг., исследовали в ИФА с помощью набора CHV (Canine Herpes Virus) IgG Ab ELISA Cat.# DE2481, DEMEDITECH (Германия), согласно приложенному протоколу.

Результаты и обсуждения

Ожидаемые продукты ПЦР к PhHV-1 в 290 пар оснований обнаружены в трех образцах, собранных в октябре 2016 г. Положительные образцы, дополнительно исследованные в ПЦР в реальном времени с праймерами к gB гену PhHV-1, также дали положительные результаты. BLAST анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей фрагмента gD гена вируса PhHV-1 каспийских тюленей показал их схожесть с таковыми изолята PB84 от европейского обыкновенного тюленя (*Phoca vitulina*) (рисунок). Анализы на PhHV-2 оказались отрицательными.

Впервые герпесвирус PhHV-1 изолирован от новорожденных обыкновенных тюленей с клиническими признаками острой пневмонии и гепатита в центре реабилитации в Нидерландах в 1985 г. [1]. У тихоокеанского обыкновенного тюленя (*Phoca vitulina richardsii*) этот вирус ассоциируется с очаговым коагулятивным некрозом коры надпочечников и печени. В филогенетических исследованиях гена ДНК-полимеразы (gB) PhHV-1 установлено их родство с герпесвирусами собак и кошек.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Phocid alphaherpesvirus 1, partial genome

Sequence ID: [MH509440.2](#) Length: 114546 Number of Matches: 1

Range 1: 110067 to 110199 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
209 bits(113)	2e-50	125/133(94%)	0/133(0%)	Plus/Plus
Query 2	ACATATCCSATWTACTTAHMTAAATATTTTAATTGCGATCCTCAAAAAGAGWTTGGTATA			61
Sbjct 110067	ACATATCCAATATATACTTAATTAATATTTTAATTGCGATCCTCAAAAAGAGTTTGGTATA			110126
Query 62	TGCTTAAAAAGAACACCCAGATTATTGGAAACCATCATTAATTGGTTATTCTTTTAAACA			121
Sbjct 110127	TGCTTAAAAAGAACACCCGATTATTGGAAACCATCATTAATTGGTTATTCTTTTAAACA			110186
Query 122	GATGATGAATTGG			134
Sbjct 110187	GATAATGAATTGG			110199

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Phocid herpesvirus-1, strain PB84 Us2 gene (partial), Us3 gene, Us4 gene, Us6 gene, Us7 gene,

Sequence ID: [AJ290955.1](#) Length: 9578 Number of Matches: 1

Range 1: 4652 to 4784 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
209 bits(113)	2e-50	125/133(94%)	0/133(0%)	Plus/Plus
Query 2	ACATATCCSATWTACTTAHMTAAATATTTTAATTGCGATCCTCAAAAAGAGWTTGGTATA			61
Sbjct 4652	ACATATCCAATATATACTTAATTAATATTTTAATTGCGATCCTCAAAAAGAGTTTGGTATA			4711
Query 62	TGCTTAAAAAGAACACCCAGATTATTGGAAACCATCATTAATTGGTTATTCTTTTAAACA			121
Sbjct 4712	TGCTTAAAAAGAACACCCGATTATTGGAAACCATCATTAATTGGTTATTCTTTTAAACA			4771
Query 122	GATGATGAATTGG			134
Sbjct 4772	GATAATGAATTGG			4784

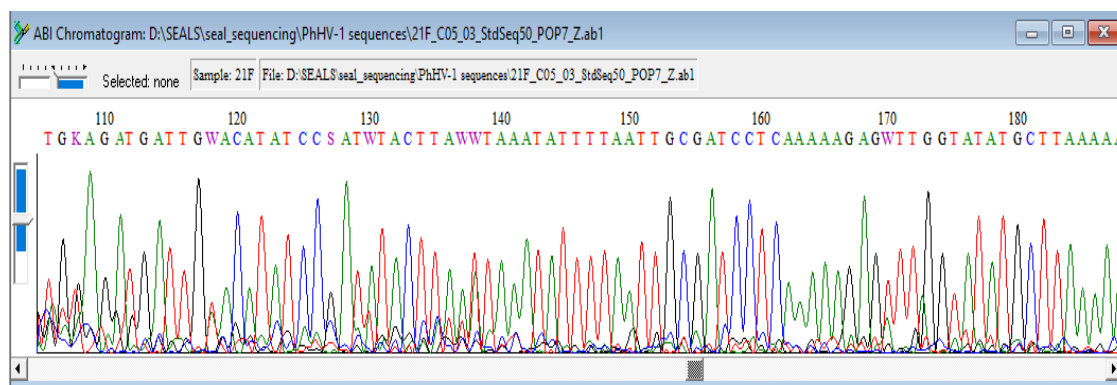


Рисунок – Результаты BLAST-анализа нуклеотидных последовательностей герпесвирусов в GenBank

Серологические исследования показали широкое распространение инфекции PhHV-1 или других близкородственных α -герпесвирусов в популяциях тюленей, обитающих в Северном море, а также в водах Антарктики и северной части Тихого океана [8, 9, 10].

С целью получения косвенных доказательств об устойчивой циркуляции PhHV-1 в популяции каспийских тюленей нами проведены серологические исследования для обнаружения антител к этому вирусу. В результате исследования в сыворотках крови каспийских тюленей антитела к PhHV-1 обнаружены в 68 из 72 образцов (94,7%).

Эти результаты аналогичны по серопозитивности к PhHV-1 у обыкновенных тюленей в Шпицбергене (Норвегия), где частота обнаружения антител варьировала от 72 до 100% в каждый год исследования [11]. На этом основании сделан вывод о том, что годовая вариация серопревалентности у обыкновенных тюленей отражает различную частоту реактивации латентного вируса под воздействием стресс-факторов, влияющих на иммунокомпетентность животных [11].

Таким образом, результаты вирусологического скрининга, молекулярно-генетических и серологических исследований показывают, что PhHV-1, вероятно, является эндемичным для каспийских тюленей, а также, возможно, вызывает постоянную вирусную нагрузку на здоровье тюленей, которая усугубляется провоцирующими факторами.

Финансирование

Исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP08856073 «Исследование вирусной метапопуляций каспийского тюленя для раннего обнаружения возбудителей новых и возвращающихся инфекций»).

Литература:

- 1 Osterhaus, A. D. M. E., Yang, H., Spijkers, H. E. M., Groen, J., Teppema, J. S. & van Steenis, G. (1985). The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the harbour seal (*Phoca vitulina*). *Archives of Virology* 86, 239–251.
- 2 Harder, T. C., Harder, M., Vos, H. W., Kulonen, K., Kennedy-Stoskopf, S., Liess, B., Appel, M. J. G. & Osterhaus, A. D. M. E. (1996). Characterization of phocid herpesvirus-1 and -2 as putative alpha- and gammaherpesviruses of North American and European pinnipeds. *Journal of General Virology* 77, 27–35.
- 3 Goldstein, T., Gulland, F.M.D., Braun, R.C., Antonelis, G.A., Kashinsky, L., Rowles, T.K., Mazet, J.A.K., Dalton, L.M., Aldridge, B.M., and Stott, J.L. (2006). Molecular identification of a novel gamma herpesvirus in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *Marine Mammal Science* 22(2): 465–471.

4 Maness, H. T. D., H. H. Nollens, E. D. Jensen, T. Goldstein, S. LaMere, A. Childress, J. Sykes, J. St. Leger, G. Lacave, F. E. Latson, and J. F. X. Wellehan (2011). Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses. *Veterinary Microbiology* 149:23–29.

5 Wright EP, Waugh LF, Goldstein T, Freeman KS, Kelly TR, Wheeler EA, Smith BR, Gulland FM. Evaluation of viruses and their association with ocular lesions in pinnipeds in rehabilitation. (2015). *Veterinary Ophthalmology*. Jan;18 Suppl 1:148-59. doi: 10.1111/vop.12235. Epub 2014 Nov 17.

6 Bodewes R., Contreras G. J., Garcia A. R., Hapsari R., van de Bildt, M.W., Kuiken T., Osterhaus AD. (2015). Identification of DNA sequences that imply a novel gammaherpesvirus in seals. *Journal of General Virology*. 96, 1109–14.

7 Gulland, F. M. D., Lowenstine, L. J., Lapointe, J. M., Spraker, T., & King, D. P. (1997). Herpesvirus infection in stranded Pacific harbor seals of coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 450–458.

8 Have, P., Nielsen, J. & Botner, A. (1991). The seal death in Danish waters 1988. II. Virological studies. *Acta veterinaria Scandinavica* 32, 211–219.

9 Harder, T. C., Plötz, P., Liess, B. (1991). Detection of antibodies against European seal herpesviruses in sera of Antarctic seals. *Polar Biology* 34, 43–47.

10 Zarnke, R. L., Harder, T. C., Vos, H. W., Ver Hoef, J. M. & Osterhaus, A. D. (1997). Serologic survey for phocid herpesvirus-1 and -2 in marine mammals from Alaska and Russia. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 459–465.

11 Roth SJ, Tischer BK, Kovacs KM, Lydersen C, Osterrieder N, Tryland M. Phocine herpesvirus 1 (PhHV-1) in harbor seals from Svalbard, Norway. *Veterinary Microbiology*. 2013;164(3-4):286-292. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.008

А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹, Қ.О. КАРАМЕНДИН¹, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹,
С.А. СҮЛЕЙМЕНОВА^{1*}, С.ГУДМАН²

¹«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы,
Қазақстан

² Жалпы және салыстырмалы биология институты, Лидс университеті,
Лидс, Ұлыбритания

*e-mail: suleymenova.87@inbox.ru

КАСПИЙ ИТБАЛЫҚТАРЫНЫҢ ГЕРПЕС ВИРУСТАРЫ (PUSA CASPICA)

Түйін

Мақалада Каспий итбалығы популяциясындағы герпесвирустардың вирусологиялық және серологиялық скринингі туралы ақпарат берілген. Каспий итбалықтарының арасында герпесвирустардың бірінші типі (PhHV-1) тұрақты айналымы көрсетілген. PhHV-1 Каспий итбалықтары үшін эндемиялық болып табылады және итбалықтардың денсаулығына тұрақты вирустық ауыртпалық тудыруы мүмкін, бұл провокациялық факторлармен күшейтіледі.

Кілтті сөздер: итбалық герпесвирустары, Каспий итбалығы, полимеразды тізбекті реакция, серология, α-герпесвирус.

IRSTI: 34.25.29; 34.25.39

A.I. KYDYRMANOV¹, K.O. KARAMENDIN¹, E.T. KASYMBEKOV¹,
S.A. SULEYMEANOVA^{1*}, S. GOODMAN²

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

² Institute of General and Comparative Biology, University of Leeds,
Leeds, United Kingdom

*e-mail: suleymenova.87@inbox.ru

HERPESVIRUSES OF THE CASPIAN SEALS (PUSA CASPICA)

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.04

Summary

The article provides information on virological and serological screening of herpesviruses in the Caspian seal population. The consistent circulation of seal herpesviruses type 1 (PhHV-1) among the Caspian seals is shown. It is noted that PhHV-1 is endemic to Caspian seals and possibly causes a constant viral load on the health of seals, which is exacerbated by provoking factors.

Keywords: seal herpesviruses, Caspian seal, polymerase chain reaction, serology, α -herpesvirus.

In recent years, thanks to large-scale studies using more advanced methods of molecular diagnostics, several viruses have been identified that infect marine mammals.

At present, seven herpesviruses (PhHV-1 – PhHV-7), belonging to the genera alpha and gamma herpesviruses [1, 2, 3, 4, 5, 6], have been isolated from seals. In the infectious pathology of these animals, herpesvirus seals 1 [Phocid Herpesvirus type 1] (PhHV-1) from the genus α -herpesviruses are the most relevant pathogen. Infection caused by these viruses in the common (*Phoca vitulina*) and gray seals (*Halichoerus grypus*) is characterised by respiratory manifestations with interstitial pneumonia and coagulative necrosis of the adrenal tissue and liver [1, 7].

To establish the range of viral pathogens affecting the Caspian seals, we carried out virological screening of biomaterials for the presence of herpesviruses.

Materials and methods

A study of 188 live samples from 47 individuals of Caspian seals collected in the Kazakhstan part of the sea in 2016-2017 was conducted by polymerase chain reaction (PCR). Samples were collected in spring and autumn at haul-out sites in the northeastern part of the sea from animals caught for satellite telemetry.

The presence of phocine α - and γ -herpesviruses (PhHV-1 and PhHV-2) was defined using primers targeting their gD and UL52 genes, respectively. The strain PhHV-1, obtained from the European Virus Archive, was used as a positive control.

For detection of antibodies to the PhHV-1 virus, serum samples collected from 2007 to 2017 were tested in ELISA using the CHV kit (Canine Herpes Virus) IgG Ab ELISA Cat. # DE2481, DEMEDITECH (Germany).

Results and discussion

Expected 290 base pairs PCR products to PhHV-1 were detected in three samples collected in October 2016. Samples were additionally tested in real-time - PCR with primers to the gB gene of PhHV-1, and positive results were also obtained. BLAST analysis of nucleotide sequence of the gD gene fragment of PhHV-1 virus from Caspian seals demonstrated their resemblance to European isolate PB84 from Common seal (*Phoca vitulina*). Tests for PhHV-2 were negative.

For the first time, the herpesvirus PhHV-1 was isolated from newborn harbor seals with clinical signs of acute pneumonia and hepatitis at a rehabilitation centre in the Netherlands in 1985 [1]. In the Pacific common seal (*Phoca vitulina richardsii*), this virus is associated with focal caogulative necrosis of the adrenal cortex and liver. In phylogenetic studies of the DNA polymerase (gB) gene of PhHV-1, their relationship with canine and feline herpesviruses has been established.

Serological studies have shown widespread infection of PhHV-1 or other closely related α -herpes viruses in seal populations of the North Sea, as well as in the Antarctic and the Northern Pacific waters [8, 9, 10].

In order to obtain additional evidence on the persistent circulation of PhHV-1 in the population of Caspian seals, we carried out serological screening to detect antibodies to this virus. Specific antibodies to PhHV-1 were detected in 68 out of 72 serum samples (94.7%) of Caspian seals.



Figure - BLAST analysis results of herpesviruses nucleotide sequences in GenBank

These results are similar in terms of PhHV-1 seropositivity in harbor seals in Svalbard, Norway, where antibody detection rates varied from 72 to 100% in each year of the study [11].

On this basis, it was concluded that the annual variation in seroprevalence in harbor seals reflects the different frequency of reactivation of the latent virus under the influence of stress factors affecting the immunocompetence of animals [11].

Thus, the results of virological and serological screening show that PhHV-1 is likely endemic to the Caspian seal and possibly causes a persistent viral burden on the health of seals, which is exacerbated by provoking factors.

Funding

This research has been/was/is funded by the Science Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP08856073).

References:

- 1 Osterhaus, A. D. M. E., Yang, H., Spijkers, H. E. M., Groen, J., Teppema, J. S. & van Steenis, G. (1985). The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the harbour seal (*Phoca vitulina*). *Archives of Virology* 86, 239–251.
- 2 Harder, T. C., Harder, M., Vos, H. W., Kulonen, K., Kennedy-Stoskopf, S., Liess, B., Appel, M. J. G. & Osterhaus, A. D. M. E. (1996). Characterization of phocid herpesvirus-1 and -2 as putative alpha- and gammaherpesviruses of North American and European pinnipeds. *Journal of General Virology* 77, 27–35.
- 3 Goldstein, T., Gulland, F.M.D., Braun, R.C., Antonelis, G.A., Kashinsky, L., Rowles, T.K., Mazet, J.A.K., Dalton, L.M., Aldridge, B.M., and Stott, J.L. (2006). Molecular identification of a novel gamma herpesvirus in the endangered Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *Marine Mammal Science* 22(2): 465–471.
- 4 Maness, H. T. D., H. H. Nollens, E. D. Jensen, T. Goldstein, S. LaMere, A. Childress, J. Sykes, J. St. Leger, G. Lacave, F. E. Latson, and J. F. X. Wellehan (2011). Phylogenetic analysis of marine mammal herpesviruses. *Veterinary Microbiology* 149:23–29.
- 5 Wright EP, Waugh LF, Goldstein T, Freeman KS, Kelly TR, Wheeler EA, Smith BR, Gulland FM. Evaluation of viruses and their association with ocular lesions in pinnipeds in rehabilitation. (2015). *Veterinary Ophthalmology*. Jan;18 Suppl 1:148-59. doi: 10.1111/vop.12235. Epub 2014 Nov 17.
- 6 Bodewes R., Contreras G. J., Garcia A. R., Hapsari R., van de Bildt, M.W., Kuiken T., Osterhaus AD. (2015). Identification of DNA sequences that imply a novel gammaherpesvirus in seals. *Journal of General Virology*. 96, 1109–14.
- 7 Gulland, F. M. D., Lowenstine, L. J., Lapointe, J. M., Spraker, T., & King, D. P. (1997). Herpesvirus infection in stranded Pacific harbor seals of coastal California. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 450–458.
- 8 Have, P., Nielsen, J. & Botner, A. (1991). The seal death in Danish waters 1988. II. Virological studies. *Acta veterinaria Scandinavica* 32, 211–219.
- 9 Harder, T. C., Plötz, P., Liess, B. (1991). Detection of antibodies against European seal herpesviruses in sera of Antarctic seals. *Polar Biology* 34, 43–47.
- 10 Zarnke, R. L., Harder, T. C., Vos, H. W., Ver Hoef, J. M. & Osterhaus, A. D. (1997). Serologic survey for phocid herpesvirus-1 and -2 in marine mammals from Alaska and Russia. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 459–465.
- 11 Roth SJ, Tischer BK, Kovacs KM, Lydersen C, Osterrieder N, Tryland M. Phocine herpesvirus 1 (PhHV-1) in harbor seals from Svalbard, Norway. *Veterinary Microbiology*. 2013;164(3-4):286-292. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.008

МРНТИ: 34.57.21

Н.Н. ГАВРИЛОВА¹, А.К. САДАНОВ¹, И.А. РАТНИКОВА^{1*}, Е.Ж. ШОРАБАЕВ²,
С.Э. ОРАЗЫМБЕТ¹, Г.К. ТАУБЕКОВА², Р.Ж., КАПТАГАЙ¹, Л.А. КОШЕЛЕВА¹,
У.Ж. КЕРЕМБЕКОВА¹, Ж.Т. МУСАБЕКОВ¹, С.Б. ДЖАЙЛАУОВА¹

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы,
Казахстан

²ТОО «Промышленная микробиология», Алматы, Казахстан

*e-mail: iratnikova@list.ru

СОЗДАНИЕ БИОПРЕПАРАТА «КАЗБИОСИЛ» В ЖИДКОМ И СУХОМ ВИДЕ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.05

Аннотация

В результате проведенных исследований разработаны оптимальные питательные среды для культивирования молочнокислых и пропионовокислых бактерий при производстве заквасок «Казбиосил».

Установлено, что срок годности жидкой закваски при хранении без протектора при температуре 6-8°C составляет 3 месяца со дня изготовления, а с сахарозой или сахарозой в сочетании с желатином в качестве протекторов – 4 месяца.

При производстве сухой закваски «Казбиосил» сублимационное высушивание концентрированной с помощью центрифугирования биомассы бактерий проводят с использованием в качестве протекторов 7% сахарозы, 1,5% желатина и 7% сухого обезжиренного молока. В качестве наполнителя при стандартизации сухого концентрата бактерий до необходимого титра рекомендовано использовать сухое обезжиренное молоко или картофельный крахмал. Установлено, что при хранении в холодильнике срок годности сухих препаратов «Казбиосил», приготовленных по разработанной технологии, составляет 12 месяцев со дня изготовления.

Показано, что с помощью жидкой и сухой заквасок «Казбиосил» можно получать качественный корм из различного вида растительного сырья.

Ключевые слова: бактерий, молочнокислые, пропионовокислые, протекторы, закваска, культивирование, концентрат.

Корма играют решающую роль не только как основной источник продуктивности животных, но и в значительной степени характеризуют эффективность производства отрасли, так как более 50% затрат ложится именно на кормление.

Среди мероприятий по укреплению кормовой базы животноводства одно из ведущих мест принадлежит производству высококачественных силосованных кормов, которые должны занимать основной удельный вес в зимних рационах скота.

Силосованный корм является универсальным, так как обеспечивает животный организм белками, углеводами и необходимыми витаминами. Снижение потерь питательных веществ и повышение качества заготавливаемых травянистых кормов является реальным резервом интенсификации кормопроизводства и приобретает на современном этапе стратегическое направление.

В последнее время широкое распространение получила технология силосования кормов с применением биологических консервантов. Содержащиеся в них живые молочнокислые микроорганизмы вызывают быстрое понижение pH за счет образования молочной кислоты. В сжатые сроки происходит консервация кормов с сохранением сухого вещества, протеина, витаминов и других питательных веществ.

В настоящее время для биологического консервирования растительных кормов предлагаются различные препараты силосных заквасок. Известна закваска для

силосования и сенажирования растительных кормов «Биотроф 2+» (Россия) на основе штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* и *Enterococcus faecium* [1].

Препарат «Лактобифадол» [2], содержащий сочетание бактериальной массы в виде *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus faecium* предназначен для силосования зеленой массы кормовых культур. Применение биопрепарата обеспечивает улучшение качества получаемого корма за счет повышения сохранности протеина, удельного веса молочной кислоты и в целом питательности корма, однако он не способен предохранять силос из высокосахаристых растений от переокисления, что может вызывать ацидозы у животных.

Известен также ряд других биоконсервантов: Литосил (Украина), Лаксил (Беларусь), закваска универсальная (Нижний Новгород, Россия), Микробелсил (Чехия), Бонсилаге и Bio-sil (Германия), Биомакс 5 и Биомакс GP (Дания) и др., содержащие смешанные культуры молочнокислых бактерий. При этом одни и те же закваски используются для консервирования как легко-, так и трудносилосуемых растений. Силосование грубых кормов в этом случае возможно лишь после предварительной обработки, а также в смеси с легкосилосующимися растениями или с различными добавками: зерноотходами, мелассой, мукой, сывороткой и т.д. [3].

ТОО «Промышленная микробиология» предложена технология заготовки силоса с использованием бактериальной закваски «Казбиосил», специализированной для определенного вида растительного сырья: трудносилосуемых растений (клевера, эспарцета, люцерны, злаковых травосмесей, тростника, естественного разнотравья) соломы и других грубостебельчатых остатков растениеводства, высокосахаристых легко силосуемых растений (кукурузы, подсолнечника, сорго) в оптимальных и высоко влажных (75-85%) фазах роста.

Биопрепарат «Казбиосил» [4] состоит из высокоактивных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Входящий в состав специализированной бактериальной закваски амилалитический молочнокислый стрептококк *Streptococcus lactis diastaticus* (АМС) обладает комплексом гидролитических ферментов, способных вовлекать в молочнокислое брожение не только простые сахара, но и сложные полисахариды, например, декстрин и крахмал. Поэтому он применяется для консервирования трудносилосуемых кормов с диапазоном влажности от 60 до 80%. Пентозосбраживающие молочнокислые бактерии *Lactobacillus pentoaceticum* (ПМБ) являются активными кислотообразователями при использовании пентозных сахаров непищевого сырья, поэтому рекомендуются для силосования соломы. При увлажнении соломы 1%-ным солевым раствором до влажности 65-70% бактерии сбраживают ксилозу и арабинозу с образованием органических кислот, подкисляя корм до pH 4,4-5,2. Пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii* (ПКБ) образуют пропионовую и уксусную кислоты при сбраживании сахаров и органических кислот, являются продуцентом витамина В₁₂. Предупреждают переокисление и плесневение корма, обогащают его витамином В₁₂. Используются совместно с АМС при силосовании высокосахаристых растений.

Создание специализированных биоконсервантов для различных видов растительного сырья позволяет расширить круг растений и отходов полеводства, вовлекаемых в кормопроизводство для приготовления качественного силоса или сенажа.

Препарат выпускается в виде жидкой культуры и однородного порошка от белого до кремового цвета [5, 6].

Приведенные факты свидетельствуют о высокой эффективности биопрепарата «Казбиосил», перспективности повышения его активности и широкого внедрения в практику.

Целью исследований было повышение эффективности биопрепарата «Казбиосил» в жидком и сухом виде за счет подбора оптимального состава питательной среды для

культивирования бактерий, протекторов для сохранения жизнеспособности бактерий в жидком и сухом препарате, наполнителя для стандартизации сухих концентрированных препаратов, а также испытание полученных биопрепаратов при консервировании растительных кормов.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штаммы бактерий: *Streptococcus lactis diastaticus* Ак-4, *Lactobacillus pentoaceticum* А-25 и *Propionibacterium shermanii* С-8.

Для поддержания культур молочнокислых и пропионовокислых бактерий использовали два варианта агаризованных питательных сред.

Первая среда имеет следующий состав (г/л): кукурузный экстракт – 15,0 (по сухому веществу); глюкоза – 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; KH_2PO_4 – 0,3; K_2HPO_4 – 0,7; NaCl – 0,7; KCl – 0,7; пептон – 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CoCl_2 – 0,01; CaCO_3 – 10,0; агар микробиологический – 12,0-15,0; вода питьевая из расчета доведения объема до 1 л; pH – 6,5-7,0.

Для поддержания культур использовали агаризованные питательные среды (г/л):

АМС

Кукурузный экстракт (по сухому веществу) – 15,0; крахмал растворимый – 10,0; мел – 10,0; автолизат дрожжей (с содержанием 0,6% аминного азота) – 10,0; агар – 20,0; вода питьевая из расчета доведения объема среды до 1 л.

ПМБ

Кукурузный экстракт (по сухому веществу) – 15,0; ксилоза или глюкоза – 20,0; NaCl – 2,0; MgSO_4 – 1,0; CaCO_3 – 10,0; агар – 20,0; вода питьевая из расчета доведения объема среды до 1 л.

ПКБ

Кукурузный экстракт – 15,0 (по сухому веществу); глюкоза – 20,0; аммоний серноокислый – 3,0; кобальт хлористый – 0,01; мел – 20,0; агар – 20,0; вода питьевая – до 1 литра.

Для получения маточной раскладки использовали те же питательные среды, но без агара.

Содержание жизнеспособных клеток молочнокислых и пропионовокислых бактерий устанавливали путем посева из разведений 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} в чашки Петри с соответствующей питательной средой для поддержания культур. Через 3 суток культивирования в термостате производили подсчет выросших колоний.

Численность микроорганизмов и биохимические показатели в силосных образцах были определены по общепринятым методам [7-9].

Результаты и обсуждение

Проведены исследования по подбору оптимальных условий культивирования штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий. За основу питательной среды взята кукурузно-сахарная среда, состоящая для молочнокислых бактерий из кукурузного экстракта (1,5% по сухому веществу (с.в.) и сахарозы (0,5-1,0%), для пропионовокислых бактерий – кукурузного экстракта (1,5% по с.в.), глюкозы (2,0%) и CoCl_2 (1мг%).

Другим вариантом питательной среды являются оптимизированная за счет добавления в ее состав крахмала, а также других компонентов. Оптимизированный состав ферментационной питательной среды для молочнокислых бактерий содержит (%): кукурузный экстракт – 2,0 (по сухому веществу); сахароза – 1,0; крахмал – 0,5; MnSO_4 – 0,02; вода питьевая – остальное. Состав ферментационной среды для пропионовокислых бактерий следующий (%): кукурузный экстракт – 2,0 (по сухому веществу); глюкоза –

1,0; крахмал – 0,5; аммоний серноокислый – 0,3; кобальт хлористый – 0,01; вода питьевая – остальное.

3-ий вариант питательной среды – комбинированная для молочнокислых и пропионовокислых бактерий, имеющая следующий состав (%): кукурузный экстракт – 1,5 (по сухому веществу); глюкоза – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,03; K_2HPO_4 – 0,07; NaCl – 0,07; KCl – 0,07; пептон – 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; CoCl_2 – 0,01; CaCO_3 – 1,0; вода питьевая – остальное.

4-ый вариант питательной среды (МРС) для молочнокислых и пропионовокислых бактерий имеет состав, %: дрожжевой экстракт – 0,5; мясной экстракт – 1,0; пептон – 1,0; глюкоза – 2,0; аммоний лимоннокислый – 0,2; натрий уксуснокислый – 0,5; твин-80 – 0,1; KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; аммоний серноокислый – 0,1; CoCl_2 – 0,01; ; вода питьевая – остальное.

Питательные среды засеивали маточной раскладкой в количестве 5%. Выращивание производили в колбах в термостате при температуре 28-30°C – ПКБ и ПМБ, при 35-37°C – АМС и 32-33°C – АМС+ПКБ в течение 18-24 ч.

Результаты по выращиванию молочнокислых и пропионовокислых бактерий на описанных выше питательных средах представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика роста бактерий на различных питательных средах

Наименование культуры	Варианты питательных сред	Титр клеток, млрд./мл
1	2	3
<i>P. shermanii</i> C-8	кукурузно-сахарная	1,0±0,2
	оптимизированная	2,8±0,3
	комбинированная	2,5±0,3
	МРС	3,0±0,3
<i>Lactobacillus pentoaceticum</i> A-25	кукурузно-сахарная	1,0±0,3
	оптимизированная	1,9±0,3
	комбинированная	1,5±0,3
	МРС	2,2±0,3

Продолжение таблицы 1

1	2	3
<i>Streptococcus lactis diastaticus</i> Ак-41	кукурузно-сахарная	1,0±0,3
	оптимизированная	3,2±0,3
	комбинированная	2,9±0,3
	МРС	3,8±0,3

Установлено, что меньшее накопление бактериальных клеток молочнокислых и пропионовокислых бактерий происходит на кукурузно-сахарной среде, большее – для всех исследуемых культур – на оптимизированной и среде МРС, которые могут быть использованы для производства жидких препаратов «Казбиосил».

Таким образом, для выращивания культур *Streptococcus lactis diastaticus* Ак-41 и *Lactobacillus pentoaceticum* A-25 подобран состав питательной среды, содержащей кукурузный экстракт – 2,0 (по сухому веществу); сахароза – 1,0; крахмал – 0,5; MnSO_4 – 0,02, вода питьевая – остальное. Оптимальная температура культивирования 35-37°C для АМС и 28-30°C для ПМБ, длительность культивирования – 18-24 часов.

Для культивирования пропионовокислых бактерий рекомендуется питательная среда, содержащая (%): кукурузный экстракт – 2,0 (по сухому веществу); глюкоза – 1,0; крахмал – 0,5; аммоний серноокислый – 0,3; кобальт хлористый – 0,01; вода питьевая – остальное. Оптимальная температура культивирования 28-30°C, длительность – 18-24 часов. На этой питательной среде можно проводить совместное культивирование АМС +

ПКБ при 28-30°C в течение 24 часов. при получении закваски для силосования высокосахаристых растений.

Для культивирования штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий, входящих в состав закваски «Казбиосил», пригодна также питательная среда МРС вышеописанного состава.

Для стабилизации жизнеспособности бактерий при хранении в жидких культурах исследованы в качестве протекторов 7% сахарозы, а также 7% сахарозы в сочетании с 1,5% желатина. Протекторы добавляли в жидкие культуры перед закладкой на хранение в холодильник при температуре 6-8°C.

Результаты по хранению жидкого препарата «Казбиосил» с протекторами и без них представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты хранения жидкого препарата «Казбиосил» при температуре 6-8°C

Питательная среда и протекторы	Содержание жизнеспособных клеток в жидком препарате после хранения, КОЕ/г					
	исходное	Через 1 мес.	Через 2 мес.	Через 3 мес.	Через 4 мес.	Через 5 мес.
<i>S. lactis diastaticus</i> Ак-41						
1 ₁	1,8±0,3x10 ⁹	1,5±0,3x10 ⁹	1,4±0,3x10 ⁹	1,2±0,2x10 ⁹	6,4±0,3x10 ⁸	5,0±0,5x10 ⁷
1 ₂	2,0±0,5x10 ⁹	1,8±0,4x10 ⁹	1,9±0,5x10 ⁹	1,6±0,3x10 ⁹	5,5±0,4x10 ⁸	7,3±0,6x10 ⁷
1 ₃	1,4±0,2x10 ⁹	1,2±0,3x10 ⁹	1,1±0,4x10 ⁹	1,0±0,3x10 ⁹	1,9±0,6x10 ⁸	1,7±0,7x10 ⁷
2 ₁	3,2±0,4x10 ⁹	3,0±0,3x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,5±0,3x10 ⁹	6,3±0,5x10 ⁸	6,0±0,6x10 ⁷
2 ₂	3,5±0,4x10 ⁹	3,4±0,5x10 ⁹	3,2±0,3x10 ⁹	2,4±0,4x10 ⁹	6,1±0,4x10 ⁸	4,1±0,6x10 ⁷
2 ₃	2,9±0,3x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,2±0,4x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁹	2,0±0,7x10 ⁸	5,5±0,6x10 ⁷
<i>L. pentoaceticum</i> А-25						
1 ₁	2,5±0,6x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,0±0,5x10 ⁹	1,5±0,5x10 ⁹	5,3±0,6x10 ⁸	4,2±0,7x10 ⁷
1 ₂	2,1±0,5x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁹	2,0±0,7x10 ⁹	1,8±0,3x10 ⁹	5,2±0,2x10 ⁸	4,5±0,5x10 ⁷
1 ₃	1,6±0,4x10 ⁹	1,4±0,3x10 ⁹	1,2±0,3x10 ⁹	1,0±0,2x10 ⁹	1,0±0,3x10 ⁸	2,0±0,7x10 ⁷
2 ₁	2,4±0,3x10 ⁹	2,2±0,5x10 ⁹	1,8±0,2x10 ⁹	1,6±0,1x10 ⁹	5,5±0,7x10 ⁸	4,5±0,3x10 ⁷
2 ₂	2,3±0,3x10 ⁹	2,0±0,5x10 ⁹	1,6±0,2x10 ⁹	1,4±0,1x10 ⁹	5,0±0,7x10 ⁸	4,7±0,3x10 ⁷
2 ₃	2,0±0,3x10 ⁹	1,7±0,5x10 ⁹	1,3±0,2x10 ⁹	1,0±0,1x10 ⁹	4,0±0,7x10 ⁷	2,1±0,3x10 ⁷
<i>P. shermanii</i> С-8						
1 ₁	2,5±0,6x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,0±0,5x10 ⁹	1,5±0,5x10 ⁹	5,0±0,6x10 ⁸	4,2±0,7x10 ⁷
1 ₂	2,1±0,5x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁹	2,0±0,7x10 ⁹	1,8±0,3x10 ⁹	5,4±0,2x10 ⁸	4,3±0,5x10 ⁷
1 ₃	1,6±0,4x10 ⁹	1,4±0,3x10 ⁹	1,2±0,3x10 ⁹	1,0±0,2x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁸	2,3±0,7x10 ⁷
2 ₁	2,7±0,3x10 ⁹	2,4±0,5x10 ⁹	2,0±0,2x10 ⁹	1,8±0,1x10 ⁹	5,0±0,7x10 ⁸	4,3±0,3x10 ⁷
2 ₂	2,4±0,3x10 ⁹	2,2±0,5x10 ⁹	1,8±0,2x10 ⁹	1,6±0,1x10 ⁹	5,5±0,7x10 ⁸	4,2±0,3x10 ⁷
2 ₃	2,4±0,3x10 ⁹	1,4±0,5x10 ⁹	1,2±0,2x10 ⁹	1,0±0,1x10 ⁹	4,0±0,7x10 ⁷	2,0±0,3x10 ⁷
Примечание – 1 - среда оптимизированная, 2 - среда МРС. Знаменатели – 1 - протектор - 7% сахарозы в сочетании с 1,5% желатина, 2 - 7% сахарозы, 3 - контроль без протектора.						

Как видно из представленной таблицы, количество жизнеспособных клеток бактерий сохраняется на необходимом уровне при хранении жидкого препарата в холодильнике в течение 3 месяцев во всех вариантах опыта. Через 4 месяца стандартный титр сохраняется у всех культур на обеих питательных средах с использованием в качестве протекторов 7% сахарозы в сочетании с 1,5% желатина или 7% сахарозы. В остальных вариантах титр клеток находится в пределах $4,0 \pm 0,7 \times 10^7$ - $1,9 \pm 0,6 \times 10^8$ КОЕ/мл, что ниже стандартного уровня ($5,0 \times 10^8$ КОЕ/мл). Через 5 месяцев хранения во всех вариантах жидкого препарата титр составлял $px10^7$ КОЕ/мл.

Таким образом, срок годности жидкой закваски при хранении без протектора при температуре 6-8°C составляет 3 месяца со дня изготовления, а с сахарозой или сахарозой в сочетании с желатином в качестве протекторов – 4 месяца.

Для получения сухого препарата выращенную жидкую культуру концентрировали с помощью центрифугирования в 10-12 раз, затем в качестве протектора добавляли в нее в растворенном виде 7% сахарозы + 1,5% желатина или же эти компоненты в сочетании с 7% сухого обезжиренного молока (СОМ). Полученную взвесь после тщательного перемешивания разливали в металлические лотки и высушивали в сублимационной сушилке Liobeta-35 при следующем режиме сушки:

Заморозка	-30°C – 10 ч
Заморозка	-60°C – 5 ч
Вакуум	0,9 мПА
Сушка 1	-26°C – 6 ч
Вакуум	1,0 мПА
Сушка 2	+20°C – 18 ч
Сушка 3	+30°C – 2 ч
Продолжительность сушки	26 часов

Результаты высушивания бактерий с различными защитными компонентами представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели качества сухих препаратов, полученных сублимационным способом

Штаммы	Защитные компоненты	Титр КЖ, млрд. КОЕ/мл	Титр сухого препарата, млрд. КОЕ/г		
			исходный	через 5 мес.	через 12 мес.
<i>S. lactis diastaticus</i> Ак-41	1	3,0	30,0	25,0	16,2
	2	3,2	35,0	30,0	28,0
<i>P. shermanii</i> С-8	1	3,5	37,5	26,2	20,0
	2	3,8	40,0	35,0	30,0
<i>L. pentoaceticum</i> А-25	1	2,8	33,5	23,0	18,0
	2	2,5	35,0	28,7	23,0
Примечание – 1) 7% сахарозы + 1,5% желатина, 2) 7% сахарозы + 1,5% желатина + 7% СОМ					

Из представленной таблицы видно, что при использовании обоих протекторов получают качественные сухие препараты, содержащие жизнеспособные клетки в количестве от 30 до 40 КОЕ/г. Однако, при использовании в качестве протектора совместно сахарозы, желатина и СОМ выживаемость бактерий при хранении несколько выше.

При производстве сухих препаратов «Казбиосил» проводят стандартизацию сублимационно высушенных концентратов бактерий до титра не менее 2 млрд.КОЕ/г.

Подбор наполнителей для стандартизации сухих препаратов произведен на примере амилотического молочнокислого стрептококка (АМС). Исходный препарат был

получен путем сублимационного высушивания отцентрифугированной биомассы с использованием в качестве защитных компонентов 7,0% СОМ, 7,0% сахарозы и 1,5% желатина. Титр сухого препарата равнялся 11×10^{10} КОЕ/г. Для стандартизации препарата использовали крахмал картофельный, муку пшеничную, молоко сухое обезжиренное и бентонит до содержания жизнеспособных клеток $10-18 \times 10^9$ КОЕ/г.

Для ускоренного определения выживаемости АМС в препаратах с различными наполнителями использовали метод прогноза стойкости, заключающийся в прогревании образцов препаратов при 60°C в течение 15 минут с последующим определением выживших клеток (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние наполнителей, используемых для стандартизации препарата, на выживаемость бактерий при хранении

Наполнитель при стандартизации	Титр бактерий при хранении, КОЕ/г				
	исходный	после прогревания	3 мес.	7 мес.	12 мес.
Бентонит	13×10^9	3×10^9	8×10^9	8×10^9	7×10^9
Мука пшеничная	10×10^9	$5,3 \times 10^8$	2×10^9	3×10^8	2×10^8
СОМ	18×10^9	13×10^9	16×10^9	14×10^9	13×10^9
Крахмал	17×10^9	14×10^9	15×10^9	12×10^9	11×10^9

Установлено, что лучшая выживаемость АМС происходит при использовании в качестве наполнителя сухого обезжиренного молока и картофельного крахмала. В этих вариантах после прогрева титр бактерий практически не изменился. При введении в препарат пшеничной муки количество жизнеспособных клеток после прогревания снизилось на 1 порядок.

Через 12 месяцев хранения в холодильнике стандартизированных препаратов в них установлены жизнеспособные клетки в количестве от 2×10^8 до 13×10^9 КОЕ/г. Большее число бактериальных клеток выявлено в вариантах с сухим обезжиренным молоком и картофельным крахмалом, меньшее – с мукой пшеничной. Таким образом, для стандартизации сухих заквасок «Казбиосил» можно использовать сухое обезжиренное молоко или крахмал картофельный.

Результаты по хранению сухих препаратов «Казбиосил», стандартизованных СОМ, представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Хранение стандартизованных СОМ сухих препаратов «Казбиосил» при температуре $+6^\circ\text{C}$

Содержание жизнеспособных клеток в сухих препаратах после хранения, КОЕ/г					
№ партии	исходное	через 2 мес.	через 5 мес.	через 7 мес.	через 12 мес.
АМС-1	$2,5 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,6 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,1 \pm 0,5 \times 10^9$
АМС-2	$3,2 \pm 0,5 \times 10^9$	$3,2 \pm 0,4 \times 10^9$	$3,1 \pm 0,3 \times 10^9$	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,2 \times 10^9$
АМС-3	$2,9 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,2 \pm 0,4 \times 10^9$
ПКБ-4	$3,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$3,5 \pm 0,5 \times 10^9$	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,8 \pm 0,6 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^9$
ПКБ-5	$2,6 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,8 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,6 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^9$
ПКБ-6	$2,7 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^9$
ПМБ-7	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,8 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^9$
ПМБ-8	$2,8 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^9$
ПМБ-9	$2,7 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,4 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,4 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^9$

Как видно из представленной таблицы, количество жизнеспособных клеток бактерий при хранении сухих препаратов в холодильнике в течение 12 месяцев остается на достаточном уровне (не менее 2,0 млрд. КОЕ/г) во всех вариантах опыта.

Испытание препаратов «Казбиосил» при консервировании растительных кормов проведено в ТОО «Амиран». При этом сенаж заложен из люцерны и ржи (50:50) с жидкой закваской «Казбиосил»-АМС, кукурузный силос - с закваской «Казбиосил»-АМС+ПКБ.

На 1 тонну силосуемого сырья расходовали 30 мл жидкой закваски, которую разбавляли в 1 л питьевой воды. На 100 тонн корма 5 л жидкой закваски сначала разводили в 10 литрах (ведро) воды, а затем в бочке со 100 литрами воды. Закваску вносили в силосную массу с помощью разбрызгивателя, представляющего собой бочку на 100 литров с трубкой-капельницей, установленную на трактор, трамбуемый силос.

Результаты микробиологического и биохимического анализа образцов консервированного корма с закваской «Казбиосил» через 3 месяца хранения представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Микробиологические и биохимические показатели сенажа из люцерны и ржи, и кукурузного силоса

Варианты опыта	Влажность, %	рН	Общая кислотность, Т	Аммиак, %	Органические кислоты, %					Микробиология, млн/г		
					свободные			связанные		ОМЧ	лактобактерии	споровые и плесневые
					молочная	уксусная	масляная	уксусная	масляная			
Сенаж (люцерна+рожь 50:50)	60,0	4,4	42,0	0,02	0,80	0,59	0,0	0,35	0,0	4,4	3,0	0,0
Силос (кукуруза)	68,0	4,2	100,0	0,01	1,12	0,56	0,0	0,31	0,0	25,0	5,0	0,0

По органолептическим показателям кукурузный силос имел цвет мокрой соломы, запах малосолевого огурца, структура растения сохранена, рН корма равнялся 4,2. Низкое содержание аммиака в корме свидетельствует о подавлении роста в нем гнилостных бактерий.

Микробиологические исследования показали присутствие в силосе из кукурузы молочнокислых бактерий и отсутствие споровых бактерий и плесневых грибов.

По полученным результатам химического анализа кукурузного силоса проведена оценка его качества в соответствии с существующими стандартами. Сопоставительный анализ показателей качества силоса приведен в таблице 7.

Таблица 7 – Анализ показателей качества силоса в соответствии с ОСТ 10202-97

Наименование показателя	Норма для класса			Образец силоса кукурузного
	I	II	III	
Массовая доля сухого вещества, % не менее	26	20	16	32,0
Масляной кислоты, % не более	0,1	0,2	0,3	0,0
Молочной кислоты в общем количестве (молочной, уксусной, масляной) кислот, % не менее	55	50	40	67,0
pH силоса из кукурузы	3,8-4,3	3,7-4,4	3,6-4,5	4,2

Как видно из представленных материалов, по органолептическим, микробиологическим показателям и составу органических кислот образец кукурузного силоса можно отнести к 1 классу качества.

Сенаж из люцерны и ржи имел цвет светлый хаки, запах – слабо консервированных овощей, структура растений сохранена. В нем содержатся молочнокислые бактерии и отсутствуют споровые бактерии и плесневые грибы (таблица 5).

Присутствие в сенаже органических кислот молочной и уксусной и pH 4,4 свидетельствуют о прохождении в сенаже молочнокислого брожения и консервации корма.

По полученным результатам проведена оценка качества сенажа в соответствии с существующим стандартом, которая представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Качество сенажа в соответствии с ОСТ 10201-97

Показатель	Нормы для класса			Сенаж из люцерны и ржи
	I	II	III	
Массовая доля сухого вещества, %	40-60	40-60	40-60	57
Массовая доля масляной кислоты, %, не более	-	0,3	0,6	0

Приведенные показатели по массовой доле сухого вещества и масляной кислоты в представленном образце соответствуют норме. Все это свидетельствует о получении качественного корма из люцерны и ржи.

Проведена оценка качества кукурузного силоса и сенажа из житняка, приготовленных с сухой закваской «Казбиосил» в ТОО «Алтынсарино» Костанайской области.

По полученным результатам микробиологического и химического анализа кукурузного силоса с сухой закваской «Казбиосил» проведена оценка его качества в соответствии с существующими стандартами. Сопоставительный анализ показателей качества силоса по основным параметрам приведен в таблице 9.

Таблица 9 – Требования к качеству кукурузного силоса (ОСТ 10202-97)

Наименование показателя	Норма для класса			Силос кукурузный с закваской
	I	II	III	
1	2	3	4	5
Массовая доля сухого вещества, % не менее	26	20	16	29,2
Массовая доля в сухом веществе сырого протеина, % не менее	7,5	7,5	7,5	8,7
Сырая клетчатка, % не более	30	33	35	30,0

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5
Сырая зола, % не более	10	11	13	7,5
Масляная кислота, % не более	0,1	0,2	0,3	0,03
Молочная кислота в общем количестве (молочной, уксусной, масляной) кислот, % не менее	55	50	40	87,4
pH силоса из кукурузы	3,8-4,3	3,7-4,4	3,6-4,5	3,8
Каротин в сухом веществе мг/кг, не менее	20	20	10	27,6

Как видно из представленной таблицы, силос с закваской «Казбиосил» по таким показателям, как массовая доля сухого вещества, массовая доля в сухом веществе сырого протеина, процент молочной кислоты от общего количества органических кислот, содержание каротина превосходит нормы, установленные для первого класса.

Микробиологические исследования показали присутствие в силосе молочнокислых и пропионовокислых бактерий и отсутствие споровых бактерий и плесневых грибов.

По органолептическим, микробиологическим и химическим показателям кукурузный силос с сухой закваской «Казбиосил» можно отнести к 1 классу качества.

Анализ качества образцов сенажа из житняка представлен в таблице 10.

Таблица 10 – Требования к качеству сенажа согласно ОСТ 10201-97

Показатель	Нормы для класса			Сенаж из житняка с закваской «Казбиосил»
	I	II	III	
Массовая доля сухого вещества, %	40-60	40-60	40-60	50,4
Массовая доля в сухом веществе сырого протеина, % не менее	12	10	8	12,5
Массовая доля в сухом веществе сырой клетчатки, % не более	30	33	35	30,0
Массовая доля в сухом веществе масляной кислоты, % не более	-	0,3	0,6	-
Массовая доля в сухом веществе сырой золы, % не более	10	11	13	6,5

Как видно из представленной таблицы, все приведенные показатели соответствуют высокому качеству сенажа.

Микробиологические исследования показали присутствие в сенаже с закваской «Казбиосил» молочнокислых бактерий и отсутствие споровых бактерий и плесневых грибов. В сенаже без закваски отсутствовали молочнокислые бактерии, однако присутствовали споровые бактерии.

Преимуществом сенажа с закваской является также более высокое содержание в нем сахара (на 0,8%), кальция (на 0,5%), фосфора (на 0,1%), каротина (на 3,9 мг/кг), переваримого протеина (на 0,7%) по сравнению с сенажом без закваски.

По органолептическим, микробиологическим и биохимическим показателям сенаж из житняка, приготовленный с закваской «Казбиосил», можно отнести к качественному корму.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработаны оптимальные питательные среды для культивирования молочнокислых и пропионовокислых бактерий при производстве заквасок «Казбиосил».

Установлено, что срок годности жидкой закваски при хранении без протектора при температуре 6-8 °С составляет 3 месяца со дня изготовления, а с сахарозой или сахарозой в сочетании с желатином в качестве протекторов – 4 месяца.

При производстве сухой закваски «Казбиосил» сублимационное высушивание концентрированной с помощью центрифугирования биомассы бактерий проводят с использованием в качестве протекторов 7% сахарозы, 1,5% желатина и 7% сухого обезжиренного молока. В качестве наполнителя при стандартизации сухого концентрата бактерий до необходимого титра рекомендовано использовать сухое обезжиренное молоко или картофельный крахмал. Установлено, что при хранении в холодильнике срок годности сухих препаратов «Казбиосил», приготовленных по разработанной технологии, составляет 12 месяцев со дня изготовления.

Показано, что с помощью жидкой и сухой заквасок «Казбиосил» можно получать качественный корм из различного вида растительного сырья.

Список использованных источников

- 1 Селиванов Д.Г., Солдатова В.В., Ыылдырым Е.А. Грамотный подход к силосованию. Консервант «Биотроф 2+» доказал свою эффективность // Животноводство России. – 2018. – №4. – С.40-42.
- 2 Пат. РФ 2477966 С2 Способ силосования зеленой массы кормовых культур / Левахин В.И., Левахин Г.И., Левахин Ю.И., Рогачев Б.Г., Поберухин М.М. и др., опубл. 27.03.2013.
- 3 Саданов А.К., Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А. Консервирование растительных кормов. – Алматы: ТОО «Эверо», 2012. – 208 с.
- 4 Пат. РК 24804 МПК: C12R 1/46, A23K 3/02, C12N 1/02, C12N 1/20 Закваска «Казбиосил» для силосования растительных кормов (варианты) / Ратникова И.А., Айткельдиева С.А., Саданов А.К., Гаврилова Н.Н., опубл. 15.04.2014.
- 5 Пат. РК 23492 МПК: C12N 1/20, C12N 1/02 Способ производства сухой бактериальной закваски для силосования кормов / Ратникова И.А., Айткельдиева С.А., Саданов А.К., Гаврилова Н.Н., опубл. 15.12.2010.
- 6 Пат. РК 23491 МПК: C12N 1/02, C12N 1/20 Способ получения пастообразного препарата для силосования кормов / Гаврилова Н.Н., Саданов А.К., Ратникова И.А., Айткельдиева С.А., опубл. 15.12.2010.
- 7 Методы биохимического исследования силоса. – Дубровицы: ВИЖ, 1967. – 89 с.
- 8 Методы биохимического исследования растений / Под. ред. д-ра биол. наук А.И. Ермакова. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – Ленинград: Колос. Ленингр. отд-ние, 1972. – 456 с.
- 9 Методические указания по оценке качества и питательности кормов / Г.С. Сычев, В.В. Лепешкин. – М.: ЦИНАО, 2002. – 76 с.

Н.Н. ГАВРИЛОВА¹, А.К. САДАНОВ¹, И.А. РАТНИКОВА^{1*}, Е.Ж. ШОРАБАЕВ²,
С.Э. ОРАЗЫМБЕТ¹, Г.К. ТАУБЕКОВА², Р.Ж., КАПТАГАЙ¹, Л.А. КОШЕЛЕВА¹,
У.Ж. КЕРЕМБЕКОВА¹, Ж.Т. МУСАБЕКОВ¹, С.Б. ДЖАЙЛАУОВА¹

¹ «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы,
Қазақстан

² " Өндірістік микробиология" ЖШС, Алматы, Қазақстан

*e-mail: iratnikova@list.ru

СҮЙЫҚ ЖӘНЕ ҚҰРҒАҚ ТҮРІНДЕ "КАЗБИОСИЛ" ПРЕПАРАТЫН ЖАСАУ

Түйін

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде "Казбиосил" ашытқысын өндіруде сүт қышқылы мен пропион қышқылы бактерияларын өсіру үшін қолайлы қоректік орталар дайындалынды.

6-8 °C температурада протекторсыз сақтау кезінде сұйық ашытқының жарамдылық мерзімі дайындалған күннен бастап 3 айды, ал протектор ретінде желатинмен бірге сахарозамен немесе сахарозамен бірге 4 айды құрайтыны анықталынды.

"Казбиосил" құрғақ ашытқысын өндіру кезінде бактериялардың биомассасын центрифугалау көмегімен қойылтылған сублимациялық кептіруді протектор ретінде 7% сахароза, 1,5% желатин және 7% құрғақ майсыздандырылған сүтті пайдалана отырып жүргізеді. Бактериялардың құрғақ концентратын қажетті титрге стандарттау кезінде толтырғыш ретінде майсыз сүт ұнтағы немесе картоп крахмалы ұсынылады. Тоңазытқышта сақтау кезінде дайындалған технология бойынша дайындалған "Казбиосил" құрғақ препараттарының жарамдылық мерзімі дайындалған күннен бастап 12 айды құрайтыны анықталды.

"Казбиосил" сұйық және құрғақ ашытқысының көмегімен әртүрлі өсімдік шикізатының түрлерінен сапалы азық алуға болатындығы көрсетілді.

Кілтті сөздер: бактериялар, сүтқышқылы, пропион қышқылы, протекторлар, ашытқы, культивирлеу, концентрат.

IRSTI: 34.57.21

N.N. GAVRILOVA¹, A.K. SADANOV¹, I.A. RATNIKOVA^{1*}, E.J. SHORABAEV²,
S.E. ORAZYMBET¹, G.K. TAUBEKOVA², R.J. KAPTAGAI¹, L.A. KOSHELEVA¹,
U.Zh. KEREMBEKOVA¹, J.T. MUSABEKOV¹, S.B. JAILAUOVA¹

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

² LLP "Industrial Microbiology", Almaty, Kazakhstan

*e-mail: iratnikova@list.ru

CREATION OF KAZBIOSIL BIOPREPARATION IN LIQUID AND DRY FORM

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.05

Summary

As a result of the studies, optimal culture media for the cultivation of lactic acid and propionic acid bacteria in the production of Kazbiosil starters were developed.

The shelf life of the liquid starter during storage without a tread at a temperature of 6-8 ° C is found to be 3 months from the date of manufacture, and with sucrose or sucrose in combination with gelatin as protectors - 4 months.

During production of Kazbiosil dry starter, sublimation drying of bacteria biomass concentrated by centrifugation is carried out using 7% sucrose, 1.5% gelatin and 7% defatted milk powder as protectors. It is recommended to use dry defatted milk or potato starch as a filler when standardizing the dry concentrate of bacteria to the required titer. It was established that when stored in a refrigerator, the shelf life of Kazbiosil dry preparations prepared according to the developed technology is 12 months from the date of manufacture.

It has been shown that with the help of liquid and dry starter "Kazbiosil" it is possible to obtain high-quality feed from various types of vegetable raw materials.

Key words: bacteria, lactic acid, propionic acid, protectors, starter, cultivation, concentrate.

Feed plays a decisive role not only as the main source of animal productivity, but also to a large extent characterizes the production efficiency of the industry, since more than 50% of the costs fall on feeding.

Among the activities to strengthen the livestock feed base, one of the leading places belongs to the production of high-quality silage feed, which should occupy the main share in winter livestock rations.

Silosated food is universal, as it provides the animal body with proteins, carbohydrates and essential vitamins. Reducing nutrient losses and improving the quality of harvested

herbaceous feed is a real reserve for intensification of fodder production and acquires a strategic direction at the present stage.

Recently, the technology of silting feed with the use of biological preservatives has become widespread. The live lactic acid microorganisms contained therein cause a rapid decrease in pH due to the formation of lactic acid. In a short time, food is preserved with the preservation of dry matter, protein, vitamins and other nutrients.

Currently, various preparations of silage starters are offered for biological preservation of plant feeds. Known starter for siltation and haemorrhaging of plant feeds "Biotrophe 2 +" (Russia) based on strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* [1].

Lactobifadol preparation [2] containing a combination of bacterial mass in the form of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus faecium* is intended for silting green mass of fodder crops. The use of the biologics improves the quality of the obtained feed by increasing the protein safety, the specific weight of lactic acid and the nutritional content of the feed in general, but it is not able to protect the silage from high-saccharide plants from overoxidation, which can cause acidoses in animals.

A number of other bioconservatives are also known: Litosil (Ukraine), Laxil (Belarus), universal starter (Nizhny Novgorod, Russia), Microbelsil (Czech Republic), Bonsilage and Biosil (Germany), Biomax 5 and Biomax GP (Denmark), etc., containing mixed cultures of lactic acid bacteria. At the same time, the same sourdough is used for canning both easily and difficult-to-suck plants. In this case, coarse feed silage is possible only after preliminary treatment, as well as in a mixture with easily sifting plants or with various additives: grain waste, molasses, flour, whey, etc. [3].

The technology of preparation of a silo with use of the bacterial Kazbiosil ferment specialized for vegetable raw materials of a certain type is offered Promyshlennaya mikrobiologiya LLP: difficult to suck plants (a clover, a cock's head, a lucerne, cereals grass mixtures, the reed natural forbs) straw and other coarse-rolling remains of crop production, high-sugary easily siloed plants (corn, sunflower, a sorghum) in optimum and highly damp (75-85%) growth phases.

The Kazbiosil biopreparation [4] consists of highly active strains of lactic acid and propionic acid bacteria. Amylolytic lactic acid *Streptococcus lactis diastaticus* (ALC), which is part of a specialized bacterial starter, has a complex of hydrolytic enzymes that can involve not only simple sugars, but also complex polysaccharides, for example, dextrin and starch, in lactic acid fermentation. Therefore, it is used to preserve difficult-to-suck feed with a humidity range of 60 to 80%. *Lactobacillus pentosaceus* pentose-inhibiting lactic acid bacteria (P-SLAB) are active acid-forming agents when using pentose sugars of non-food raw materials, therefore they are recommended for straw siltation. When straw is moistened with 1% saline solution till moisture content is 65-70%, bacteria ferment xylose and arabinose with formation of organic acids, acidifying feed till pH 4.4-5.2. Propionic acid bacteria *Propionibacterium shermanii* (PKB) form propionic and acetic acids when fermenting sugars and organic acids, are a producer of vitamin B₁₂. The feed is prevented from peroxidation and moulding, enriched with vitamin B₁₂. They are used in conjunction with ALC in the siltation of highly saccharide plants.

Creation of specialized bioconservants for different types of plant raw materials allows to expand the range of plants and wastes of field growing involved in fodder production for preparation of high-quality silage or haylage.

The product is available in the form of a liquid culture and a uniform white to cream powder [5, 6].

These facts indicate the high effectiveness of the Kazbiosil biologic, the prospects for increasing its activity and widespread implementation in practice.

The purpose of the studies was to increase the effectiveness of the Kazbiosil biologic in liquid and dry form by selecting the optimal composition of the culture medium for culturing bacteria, protectors for preserving the viability of bacteria in a liquid and dry preparation, a filler for standardizing dry concentrated preparations, as well as testing the obtained biologics when preserving plant feed.

Materials and methods of reaserch

Strains of bacteria were used in the work: *Streptococcus lactis diastaticus* Ak-4, *Lactobacillus pentoaceticum* A-25 and *Propionibacterium shermanii* S-8.

Two variants of agarised culture media were used to maintain lactic acid and propionic acid bacteria cultures.

The first medium has the following composition (g/l): corn extract - 15.0 (dry matter); glucose - 20.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1.0; KN_2PO_4 - 0.3; K_2NPO_4 - 0.7; NaCl - 0.7; KCl - 0.7; peptone - 3.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5; CoCl_2 - 0.01; CaCO_3 - 10.0; microbiological agar - 12.0-15.0; drinking water based on volume increase to 1 l; pH 6.5-7.0.

Agarized culture media (g/l) were used to maintain the cultures:

ALS

Corn extract (dry matter) - 15.0; soluble starch - 10.0; chalk - 10.0; yeast autolysate (with content of 0.6% amine nitrogen) - 10.0; agar - 20.0; drinking water based on bringing the volume of the medium to 1 liter.

P-SLAB

Corn extract (dry matter) - 15.0; xylose or glucose - 20.0; NaCl - 2.0; MgSO_4 - 1.0; CaCO_3 - 10.0; agar - 20.0; drinking water based on bringing the volume of the medium to 1 liter.

PAB

Corn extract - 15.0 (dry matter); glucose - 20.0; ammonium sulphate - 3.0; cobalt chloride - 0.01; chalk - 20.0; agar - 20.0; drinking water - up to 1 liter.

The same culture media but no agar were used to prepare the mother liquor.

The content of viable lactic acid and propionic acid bacteria cells was established by inoculation from dilutions 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} into petri dishes with the appropriate culture maintenance medium. After 3 days of cultivation, the grown colonies were counted in the thermostat.

Microbial abundance and biochemical parameters in silage samples were determined by conventional methods [7-9].

Research results and discussion

Studies were carried out to select the optimal conditions for culturing strains of lactic acid and propionic acid bacteria. The nutrient medium is based on a corn-sugar medium consisting of lactic acid bacteria from corn extract (1.5% by dry substance (sv) and sucrose (0.5-1.0%), for propionic acid bacteria - corn extract (1.5% by sv), glucose (2.0%) and CoC_{12} (1 mg%).

Another variant of the culture medium is optimized by adding starch as well as other components to its composition. The optimized composition of the fermentation culture medium for lactic acid bacteria contains (%): corn extract - 2.0 (dry matter); sucrose - 1.0; starch - 0.5; MnSO_4 - 0.02; drinking water - the rest. The composition of the fermentation medium for propionic acid bacteria is as follows (%): corn extract - 2.0 (dry matter); glucose - 1.0; starch - 0.5; ammonium sulphate - 0.3; cobalt chloride - 0.01; drinking water - the rest.

The 3rd variant of the culture medium is combined for lactic acid and propionic acid bacteria, having the following composition (%): corn extract - 1.5 (dry matter); glucose - 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.1; KN_2RO_4 - 0.03; K_2NPO_4 - 0.07; NaCl - 0.07; KCl - 0.07; peptone - 0.3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.05; CoCl_2 - 0.01; CaCO_3 - 1.0; drinking water - the rest.

The 4th version of the culture medium (MRS) for lactic acid and propionic acid bacteria has the composition, %: yeast extract - 0.5; meat extract - 1.0; peptone - 1.0; glucose - 2.0; ammonium citric acid - 0.2; sodium acetic acid - 0.5; tween-80 - 0.1;

KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; ammonium sulphate - 0.1; CoCl_2 – 0,01; drinking water - the rest.

Culture media were inoculated with 5% masterbatch. Cultivation was carried out in flasks in a thermostat at a temperature of 28-30 °C - PAB and P-SLAB, at 35-37 °C - ALC and 32-33 °C - ALC + PAB for 18-24 hours.

The results of growing lactic acid and propionic acid bacteria on the above-described culture media are presented in Table 1.

Table 1 - Comparative characteristics of bacterial growth on different nutrient media

Culture name	Culture Media Options	Cell titer, bln/mL
<i>P. shermanii</i> C-8	corn and sugar	1,0±0,2
	optimized	2,8±0,3
	combined	2,5±0,3
	MRS	3,0±0,3
<i>Lactobacillus pentoaceticum</i> A-25	corn and sugar	1,0±0,3
	optimized	1,9±0,3
	combined	1,5±0,3
	MRS	2,2±0,3
<i>Streptococcus lactis diastaticus</i> Ak-41	corn and sugar	1,0±0,3
	optimized	3,2±0,3
	combined	2,9±0,3
	MRS	3,8±0,3

It was found that less accumulation of bacterial cells of lactic acid and propionic acid bacteria occurs on corn-sugar medium, more - for all studied crops - on optimized and MRS medium, which can be used for the production of liquid preparations "Kazbiosil."

Thus, for the cultivation of cultures *Streptococcus lactis diastaticus* Ak-41 and *Lactobacillus pentoaceticum*, the composition of the nutrient medium containing corn extract A-25 selected - 2.0 (dry matter); sucrose - 1.0; starch - 0.5; MnSO_4 -0.02, drinking water - the rest. Optimal 35-37°C cultivation temperature for ALC and 28-30 °C for P-SLAB, cultivation duration - 18-24 hours.

For cultivation of propionic acid bacteria, a nutrient medium is recommended, containing (%): corn extract - 2.0 (dry matter); glucose - 1.0; starch - 0.5; ammonium sulphate - 0.3; cobalt chloride - 0.01; drinking water - the rest. Optimal cultivation temperature 28-30°C, duration - 18-24 hours. Co-cultivation of ALC + PAB at 28-30°C for 24 hours can be carried out on this culture medium. obtaining a starter for siltation of high-saccharide plants.

For culturing strains of lactic acid and propionic acid bacteria included in the composition of the starter "Kazbiosil," the culture medium of the above composition is also suitable.

To stabilize the viability of bacteria when stored in liquid cultures, 7% sucrose, as well as 7% sucrose in combination with 1.5% gelatin, were investigated as protectors. The protectors were added to the liquid cultures before being stored in a refrigerator at a temperature of 6-8°C.

The results of storage of the liquid product Kazbiosil with and without protectors are presented in Table 2.

Table 2 - Results of storage of liquid product "Kazbiosil" at 6-8°C

Culture medium and	Content of viable cells in the liquid product after storage, CFU/g					
	Initial	After 1 month	After 2 month	After 3 month	After 4 month	After 5 month
<i>S. lactis diastaticus</i> Ак-41						
1 ₁	1,8±0,3x10 ⁹	1,5±0,3x10 ⁹	1,4±0,3x10 ⁹	1,2±0,2x10 ⁹	6,4±0,3x10 ⁸	5,0±0,5x10 ⁷
1 ₂	2,0±0,5x10 ⁹	1,8±0,4x10 ⁹	1,9±0,5x10 ⁹	1,6±0,3x10 ⁹	5,5±0,4x10 ⁸	7,3±0,6x10 ⁷
1 ₃	1,4±0,2x10 ⁹	1,2±0,3x10 ⁹	1,1±0,4x10 ⁹	1,0±0,3x10 ⁹	1,9±0,6x10 ⁸	1,7±0,7x10 ⁷
2 ₁	3,2±0,4x10 ⁹	3,0±0,3x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,5±0,3x10 ⁹	6,3±0,5x10 ⁸	6,0±0,6x10 ⁷
2 ₂	3,5±0,4x10 ⁹	3,4±0,5x10 ⁹	3,2±0,3x10 ⁹	2,4±0,4x10 ⁹	6,1±0,4x10 ⁸	4,1±0,6x10 ⁷
2 ₃	2,9±0,3x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,2±0,4x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁹	2,0±0,7x10 ⁸	5,5±0,6x10 ⁷
<i>L. pentoaceticum</i> A-25						
1 ₁	2,5±0,6x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,0±0,5x10 ⁹	1,5±0,5x10 ⁹	5,3±0,6x10 ⁸	4,2±0,7x10 ⁷
1 ₂	2,1±0,5x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁹	2,0±0,7x10 ⁹	1,8±0,3x10 ⁹	5,2±0,2x10 ⁸	4,5±0,5x10 ⁷
1 ₃	1,6±0,4x10 ⁹	1,4±0,3x10 ⁹	1,2±0,3x10 ⁹	1,0±0,2x10 ⁹	1,0±0,3x10 ⁸	2,0±0,7x10 ⁷
2 ₁	2,4±0,3x10 ⁹	2,2±0,5x10 ⁹	1,8±0,2x10 ⁹	1,6±0,1x10 ⁹	5,5±0,7x10 ⁸	4,5±0,3x10 ⁷
2 ₂	2,3±0,3x10 ⁹	2,0±0,5x10 ⁹	1,6±0,2x10 ⁹	1,4±0,1x10 ⁹	5,0±0,7x10 ⁸	4,7±0,3x10 ⁷
2 ₃	2,0±0,3x10 ⁹	1,7±0,5x10 ⁹	1,3±0,2x10 ⁹	1,0±0,1x10 ⁹	4,0±0,7x10 ⁷	2,1±0,3x10 ⁷
<i>P. shermanii</i> C-8						
1 ₁	2,5±0,6x10 ⁹	2,5±0,4x10 ⁹	2,0±0,5x10 ⁹	1,5±0,5x10 ⁹	5,0±0,6x10 ⁸	4,2±0,7x10 ⁷
1 ₂	2,1±0,5x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁹	2,0±0,7x10 ⁹	1,8±0,3x10 ⁹	5,4±0,2x10 ⁸	4,3±0,5x10 ⁷
1 ₃	1,6±0,4x10 ⁹	1,4±0,3x10 ⁹	1,2±0,3x10 ⁹	1,0±0,2x10 ⁹	2,0±0,3x10 ⁸	2,3±0,7x10 ⁷
2 ₁	2,7±0,3x10 ⁹	2,4±0,5x10 ⁹	2,0±0,2x10 ⁹	1,8±0,1x10 ⁹	5,0±0,7x10 ⁸	4,3±0,3x10 ⁷
2 ₂	2,4±0,3x10 ⁹	2,2±0,5x10 ⁹	1,8±0,2x10 ⁹	1,6±0,1x10 ⁹	5,5±0,7x10 ⁸	4,2±0,3x10 ⁷
2 ₃	2,4±0,3x10 ⁹	1,4±0,5x10 ⁹	1,2±0,2x10 ⁹	1,0±0,1x10 ⁹	4,0±0,7x10 ⁷	2,0±0,3x10 ⁷
Note - 1 - optimized medium, 2 - MRS medium. Denominators - 1 - protector - 7% sucrose in combination with 1.5% gelatin, 2 - 7% sucrose, 3 - control without protector.						

As can be seen from the presented table, the number of viable bacterial cells is maintained at the required level when the liquid preparation is stored in the refrigerator for 3 months in all test variants. After 4 months, the standard titer was maintained in all cultures on both culture media using 7% sucrose in combination with 1.5% gelatin or 7% sucrose as protectors. In other variants, the cell titer is within the limits of 4,0±0,7x10⁷ - 1,9±0,6x10⁸ CFU/ml, which is below the standard level (5,0x10⁸ CFU/ml). After 5 months storage in all liquid formulations, the titer was nx10⁷ CFU/ml.

Thus, the shelf life of the liquid starter when stored without a tread at a temperature of 6-8°C is 3 months from the date of manufacture, and with sucrose or sucrose in combination with gelatin as treads - 4 months.

To obtain a dry preparation, the grown liquid culture was concentrated by centrifugation 10-12 times, then 7% sucrose + 1.5% gelatin was added as a protector, or these components

were combined with 7% defatted milk powder (SMP). After thorough mixing, the resulting slurry was poured into metal trays and dried in a freeze dryer Liobeta-35 under the following drying conditions:

Freezing - 30°C - 10 h

Freezing - 60°C - 5 h

Vacuum - 0.9 mPA

Drying 1 - 26°C - 6 h

Vacuum 1.0 mPA

Drying 2 + 20°C - 18 h

Drying 3 + 30°C - 2 h

Drying time 26 hours

The results of drying bacteria with different protective components are shown in Table 3.

Table 3 - Quality parameters of dry products obtained by the sublimation method

Strains	Protective components	CF titer, billion CFU/mL	Dry product titer, billion CFU/g		
			Initial	After 5 months	After 12 months
1	2	3	4	5	6
<i>S. lactis diastaticus</i> Ак-41	1	3,0	30,0	25,0	16,2
	2	3,2	35,0	30,0	28,0
1	2	3	4	5	6
<i>P. shermanii</i> C-8	1	3,5	37,5	26,2	20,0
	2	3,8	40,0	35,0	30,0
<i>L. pentoaceticum</i> A-25	1	2,8	33,5	23,0	18,0
	2	2,5	35,0	28,7	23,0
Note - 1) 7% sucrose + 1.5% gelatin, 2) 7% sucrose + 1.5% gelatin + 7% SMP					

It can be seen from the table that the use of both protectors produces qualitative dry preparations containing viable cells in an amount of 30 to 40 CFU/g. However, when sucrose, gelatin and SMP are used as a protector together, the survival of bacteria during storage is slightly higher.

At production of dry preparations "Kazbiosil" it is necessary to standardize sublimation dried concentrates of bacteria to titer of at least 2 billion. CFU/g.

The selection of excipients for the standardization of dry preparations was made on the example of amylolytic lactic acid streptococcus (ALC). The parent preparation was prepared by sublimation drying the centrifuged biomass using 7.0% SMP, 7.0% sucrose and 1.5% gelatin as protective components. The titer of the dry product was 11×10^{10} CFU/g. Potato starch, wheat flour, dry defatted milk and bentonite were used to standardize the preparation to a viable cell content of $10-18 \times 10^9$ CFU/g.

To rapidly determine the survival of ALC in preparations with different excipients, a method for predicting resistance was used, which consisted in warming drug samples at 60°C for 15 minutes, followed by the determination of surviving cells (Table 4).

Table 4 - Effect of excipients used for product standardization on bacterial survival at storage

Filler during standardization	Bacterial titer at storage, CFU/g				
	Initial	After warming up	3 months	7 months	12 months
Bentonite	13×10^9	3×10^9	8×10^9	8×10^9	7×10^9
Wheat flour	10×10^9	$5,3 \times 10^8$	2×10^9	3×10^8	2×10^8
SMP	18×10^9	13×10^9	16×10^9	14×10^9	13×10^9
Starch	17×10^9	14×10^9	15×10^9	12×10^9	11×10^9

It has been found that the best survival of ALC occurs when using skimmed milk powder and potato starch as a filler. In these embodiments, after warming up, the titer of bacteria practically did not change. When wheat flour is injected into the preparation, the number of viable cells after warming decreased by 1 order of magnitude.

After 12 months of storage in the refrigerator of standardized preparations, viable cells in the amount of 2×10^8 to 13×10^9 CFU/g were installed in them. A larger number of bacterial cells were detected in versions with dry defatted milk and potato starch, a smaller number - with wheat flour. Thus, dry defatted milk or potato starch can be used to standardize Kazbiosil dry starter.

The results for storage of Kazbiosil dry products standardized by SMP are presented in Table 5.

Table 5 - Storage of standardized SMP of Kazbiosil dry products at + 6°C

Batch No.	Content of viable cells in dry preparations after storage, CFU/g				
	Initial	After 2 months	After 5 months	After 7 months	After 12 months
ALC-1	$2,5 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,6 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,1 \pm 0,5 \times 10^9$
ALC-2	$3,2 \pm 0,5 \times 10^9$	$3,2 \pm 0,4 \times 10^9$	$3,1 \pm 0,3 \times 10^9$	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,2 \times 10^9$
ALC-3	$2,9 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,2 \pm 0,4 \times 10^9$
PAB-4	$3,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$3,5 \pm 0,5 \times 10^9$	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,8 \pm 0,6 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^9$
ПАБ-5	$2,6 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,8 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,6 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^9$
ПАБ-6	$2,7 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^9$
P-SLAB-7	$3,0 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,8 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^9$
P-SLAB-8	$2,8 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^9$
P-SLAB-9	$2,7 \pm 0,5 \times 10^9$	$2,6 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,4 \pm 0,3 \times 10^9$	$2,4 \pm 0,4 \times 10^9$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^9$

As can be seen from the presented table, the number of viable bacterial cells during storage of dry preparations in the refrigerator for 12 months remains at a sufficient level (not less than 2.0 billion CFU/g) in all case studies.

Testing of Kazbiosil preparations during preservation of vegetable feeds was carried out in Amiran LLP. At the same time, hay is laid from alfalfa and rye (50:50) with liquid leaven "Kazbiosil" -ALC, corn silage - with leaven "Kazbiosil" -ALC + PAB.

1 ton of liquid starter was used per 30 ml of silage feed, which was diluted in 1 l of drinking water. For 100 tons of feed, 5 liters of liquid starter were first diluted in 10 liters (bucket) of water, and then in a barrel with 100 liters of water. The starter was introduced into the silage mass using a sprinkler, which is a 100-liter barrel with a dropper tube mounted on a tractor ramming the silo.

The results of microbiological and biochemical analysis of samples of preserved feed with Kazbiosil starter after 3 months of storage are presented in Table 6.

Table 6 - Microbiological and biochemical parameters of alfalfa, rye and corn silage

Experience options	Humidity, %	pH	Total acidity, T	Ammonia, %	Organic acids, %					Microbiology, mln/g		
					free			connected		OM ₄	lactobacilli	spore and mold
					dairy	acetic	oil	acetic	oil			
Hay (alfalfa + rye 50:50)	60,0	4,4	42,0	0,02	0,80	0,59	0,0	0,35	0,0	4,4	3,0	0,0
Silo (corn)	68,0	4,2	100,0	0,01	1,12	0,56	0,0	0,31	0,0	25,0	5,0	0,0

According to organoleptic indicators, corn silage had a wet straw color, the smell of low-salted cucumber, the structure of the plant was preserved, the pH of the feed was 4.2. The low content of ammonia in the feed indicates a suppression of the growth of putrid bacteria in it.

Microbiological studies showed the presence of lactic acid bacteria in the corn silo and the absence of spore bacteria and mold fungi.

Based on the results of chemical analysis of corn silage, its quality was assessed in accordance with existing standards. Comparative analysis of silo quality parameters is given in Table 7.

Table 7 - Analysis of silo quality indicators in accordance with IS 10202-97

Indicator name	Class Norm			Corn Silo Sample
	I	II	III	
Dry matter mass fraction, % not less than	26	20	16	32,0
Butyric acid, % not more than	0,1	0,2	0,3	0,0
Lactic acid in general amount of (lactic, acetic, butyric) acids, % not less than	55	50	40	67,0
pH of corn silage	3,8-4,3	3,7-4,4	3,6-4,5	4,2

As can be seen from the presented materials, according to the organoleptic, microbiological indicators and the composition of organic acids, the sample of corn silage can be classified as class 1 quality.

Senage from alfalfa and rye had a light khaki color, the smell was poorly preserved vegetables, the structure of the plants was preserved. It contains lactic acid bacteria and is free of spore bacteria and mold fungi (Table 5).

The presence of organic acids of lactic and acetic acids in the haylage and pH 4.4 indicate the passage of lactic acid fermentation and preservation of feed in the haylage.

Based on the obtained results, haylage quality was assessed in accordance with the existing standard, which is presented in Table 8.

Table 8 - Haylage quality in accordance with IS 10201-97

Indicator	Class standards			Alfalfa and rye haylage
	I	II	III	
Dry matter mass fraction, %	40-60	40-60	40-60	57
Weight fraction of butyric acid, %, not more than	-	0,3	0,6	0

The given parameters for the mass fraction of dry substance and butyric acid in the presented sample comply with the norm. All this indicates the receipt of high-quality food from alfalfa and rye.

The quality of corn silage and haylage from gritters prepared with dry sourdough "Kazbiosil" in Altynsarino LLP of Kostanay region was assessed.

Based on the obtained results of microbiological and chemical analysis of corn silage with Kazbiosil dry starter, its quality was assessed in accordance with existing standards. Comparative analysis of silo quality indicators by main parameters is given in Table 9.

Table 9 - Corn Silage Quality Requirements (IS 10202-97)

Indicator name	Class norm			Corn silage with sourdough
	I	II	III	
Dry matter mass fraction, % not less than	26	20	16	29,2
Mass fraction in dry substance raw protein, % not less than	7,5	7,5	7,5	8,7
Raw fiber, % not more than	30	33	35	30,0
Raw ash, % not more than	10	11	13	7,5
Butyric acid, % not more than	0,1	0,2	0,3	0,03
Lactic acid in general amount of (lactic, acetic, butyric) acids, % not less than	55	50	40	87,4
pH of corn silage	3,8-4,3	3,7-4,4	3,6-4,5	3,8
Carotene in dry substance mg/kg, not less than	20	20	10	27,6

As can be seen from the presented table, the Casbiosil starter silo in terms of such parameters as the mass fraction of dry matter, the mass fraction of raw protein in dry matter, the percentage of lactic acid from the total amount of organic acids, the carotene content exceeds the norms established for the first class.

Microbiological studies showed the presence of lactic acid and propionic acid bacteria in the silage and the absence of spore bacteria and mold fungi.

According to organoleptic, microbiological and chemical indicators, Kazbiosil corn silage with dry starter can be classified as class 1 quality.

Quality analysis of haylage samples from the granary is presented in Table 10.

Table 10 - Haylage quality requirements according to IS 10201-97

Indicator	Class standards			Senage from the granny with sourdough "Kazbiosil"
	I	II	III	
1	2	3	4	5
Dry matter mass fraction, %	40-60	40-60	40-60	50,4
Mass fraction in dry substance of crude protein, % not less than	12	10	8	12,5
Mass fraction in dry substance of crude fiber, % not more than	30	33	35	30,0

Continuation of table 10

1	2	3	4	5
Mass fraction in dry substance of butyric acid, % not more than	-	0,3	0,6	-
Mass fraction in dry substance of raw ash, % not more than	10	11	13	6,5

As can be seen from the presented table, all the given indicators correspond to the high quality of haylage.

Microbiological studies showed the presence of lactic acid bacteria and the absence of spore bacteria and mold fungi in the haylage with Kazbiosil starter. There were no lactic acid bacteria in the haylage without starter, but spore bacteria were present.

The advantage of haylage with starter is also a higher content of sugar (by 0.8%), calcium (by 0.5%), phosphorus (by 0.1%), carotene (by 3.9 mg/kg), digestible protein (by 0.7%) compared to haylage without starter.

According to organoleptic, microbiological and biochemical indicators, haylage from granary prepared with Kazbiosil sourdough can be attributed to high-quality feed.

Thus, as a result of the studies, optimal culture media for the cultivation of lactic acid and propionic acid bacteria during the production of Kazbiosil starters were developed.

The shelf life of the liquid starter during storage without a tread at a temperature of 6-8°C is found to be 3 months from the date of manufacture, and with sucrose or sucrose in combination with gelatin as protectors - 4 months.

During production of Kazbiosil dry starter, sublimation drying of bacteria biomass concentrated by centrifugation is carried out using 7% sucrose, 1.5% gelatin and 7% defatted milk powder as protectors. It is recommended to use dry defatted milk or potato starch as a filler when standardizing the dry concentrate of bacteria to the required titer. It was established that when stored in a refrigerator, the shelf life of Kazbiosil dry preparations prepared according to the developed technology is 12 months from the date of manufacture.

It has been shown that with the help of liquid and dry starter "Kazbiosil" it is possible to obtain high-quality feed from various types of vegetable raw materials.

List of sources used

1 Selivanov D.G., Soldatova V.V., Yildirim E.A. Competent approach to silage. Preservative "Biotrof 2 +" has proven its effectiveness//Animal husbandry in Russia. – 2018. – №4. - S.40-42.

2 Pat. RF 2477966 S2 Method of Silencing Green Mass of Fodder Crops/V.I. Levakhin, G.I. Levakhin, Y.I. Levakhin, B.G. Rogachev, M.M. Poberukhin, et al., publ. 27.03.2013.

3 Sadanov A.K., Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Conservation of plant foods. - Almaty: Evero LLP, 2012. - 208 s.

4 Pat. RK 24804 MPK: C12R 1/46, A23K 3/02, C12N 1/02, C12N 1/20 Zakvaska "Kazbiosil" for silencing plant feed (options)/Ratnikova I.A., Aitkeldieva S.A., Sadanov A.K., Gavrilova N.N., publ. 15.04.2014.

5 Pat. RK 23492 MPK: C12N 1/20, C12N 1/02 Production Method of Dry Bacterial Starter for Feed Silencing/Ratnikova I.A., Aitkeldieva S.A., Sadanov A.K., Gavrilova N.N., publ. 15.12.2010.

6 Pat. RK 23491 MPK: C12N 1/02, C12N 1/20 Method of Producing a Paste Preparation for Feed Silencing/N.N. Gavrilova, A.K. Sadanov, I.A. Ratnikova, S.A. Aitkeldiyeva, publ. 15.12.2010.

7 Methods of biochemical research of silage. - Dubrovitsy: VIZH, 1967. - 89 s.

8 Methods of biochemical research of plants/Under. ed. Dr. Biologist. sciences A.I. Ermakov. - Ed. 2nd, reworked. and additional - Leningrad: Kolos. Leningr. Department, 1972. - 456 s.

9 Methodological Guidelines for Evaluation of Feed Quality and Nutritional Content/G.S. Sychev, V.V. Lepeshkin. - M.: TSINAO, 2002. - 76 s.

МРНТИ: 34.27.17

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы,
Казахстан

² Институт микробиологии национальной академии наук Азербайджана, Баку,
Азербайджан

*e-mail.ru: iesmirnova@mail.ru

ПОДБОР ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.06

Аннотация

Основными кормо-бобовыми культурами в Казахстане являются люцерна и донник, но при их выращивании существуют проблема низкой всхожести семян. Для повышения всхожести и урожайности этих культур наиболее перспективным является применение биологического способа на основе использования целлюлолитических бактерий. Для разработки биоудобрения на основе этих бактерий необходима высокая рентабельность их производства. Одним из путей снижения затрат является подбор оптимальных источников питания для повышения выхода биомассы бактерий. Целью данного исследования являлся подбор оптимальных источников углерода для культивирования целлюлолитических бактерий с повышенным выходом биомассы и высокой активностью ферментов-целлюлаз. Проведен подбор источников углеродного питания для трех штаммов целлюлолитических бактерий. Установлено, что максимальное накопление биомассы бактерий происходит на питательной среде с пшеничной соломой. Накопление биомассы на питательной среде с лактозой было несколько ниже и составляло 2,7–2,9 г/л, но активность целлюлаз при выращивании бактерий на этих источниках углерода была практически равной. Однако при наращивании биомассы бактерий в ферментерах производственного типа пшеничную солому невозможно использовать в качестве источника углерода. В связи с этим, для культивирования целлюлолитических бактерий в качестве источника углерода отобрана лактоза.

Ключевые слова: целлюлолитические бактерии, культивирование, источники углерода, целлюлазная активность, лактоза

Основными кормо-бобовыми культурами в Казахстане являются люцерна и донник. Люцерна является ведущей кормовой культурой мирового масштаба, ее используют как для кормления свежескошенной зеленой массой, так и для заготовки силоса и сенажа [1]. Культура отличается долголетием, многоукосностью и дает высокий урожай зеленой массы. Корма из люцерны являются источником растительного белка и клетчатки, содержат кальций, калий, бета-каротин, витамин К, витамины группы В, а также микро- и макроэлементы, и другие полезные вещества для животных [2,3].

Не менее важной кормовой культурой является донник, который ещё недостаточно широко используется в кормопроизводстве Казахстана. Это высокоурожайная кормовая культура, не уступающая люцерне по питательной ценности. Преимуществом донника является его высокая экологическая пластичность, хороший рост на засоленных и малоплодородных почвах, наличие ценных агробиологических свойств, таких как, высокое содержание белка, способность к азотфиксации, засухоустойчивость, зимостойкость и скороспелость. Также при выращивании донника, за счет разложения корневой массы в почве, повышается содержание гумуса. Установлено, что из растительной массы донника в почве образуется более 2 т/га активного гумуса [4].

Кроме того, донник является фитомелиорантом и способствует рассолению почв, что крайне важно для почв Казахстана [5,6].

При выращивании донника и люцерны существуют проблема низкой всхожести семян. Это связано с тем, что часть семян этих культур имеет плотную и твердую оболочку, препятствующую их всхожести, такие семена называют твердокаменными [7,8]. Поля, засеянные донником и люцерной, часто на 1/4 остаются пустыми, так как из посеянных семян всходит только 30–40%, а в некоторых регионах - менее 15-20% семян, что приводит к разреженности посевов и снижению урожайности культур [9,10].

Существуют различные способы повышения всхожести семян, наиболее часто используют механическую скарификацию, основанную на применении специальных машин-скарификаторов, разрушающих твердую оболочку семян. Однако при применении механической скарификации происходит повреждение не только оболочки, но и зародыша семян, что приводит к плесневению и загниванию семян и гибели проростков. Также скарификация требует значительных материальных и энергетических расходов.

В этой связи, разработка приемов повышения всхожести и урожайности кормовых культур на основе биологических способов имеет высокую актуальность. Наиболее эффективным биологическим методом является обработка семян целлюлолитическими бактериями. Целлюлолитические бактерии синтезируют особые ферменты - целлюлазы, которые частично разрушают твердую оболочку семян, делая ее менее плотной для прорастания. Этот процесс заменяет механическую скарификацию семян.

При создании биоудобрения важным фактором является рентабельность его производства. Одним из путей снижения затрат на его производство является подбор оптимальных источников питания для повышения выхода биомассы бактерий с единицы затрачиваемого углеродного субстрата.

Питательной средой для культивирования целлюлолитических бактерий является элективная среда Гетчинсона, в которой источником углерода является пшеничная солома. При наращивании биомассы бактерий в ферментерах производственного типа этот источник углерода использовать невозможно, поэтому был проведен альтернативный подбор источников углеродного питания. Целью данного исследования являлся подбор оптимального источника углерода для культивирования целлюлолитических бактерий с повышенным выходом биомассы этих бактерий с высокой активностью ферментов-целлюлаз.

Материалы и методы

Объектом исследований служили три отобранных штамма целлюлолитических бактерий (C-21(18)N, C-182K и C-21N2), показавших наиболее высокие результаты в лабораторных и полевых опытах.

Культивирование микроорганизмов проводили на элективной жидкой питательной среде Гетчинсона глубинным способом на качалке со скоростью вращения 180 об/мин в колбах Эрленмейера (750 мл) при объеме среды 250 мл. Оптимальные параметры культивирования бактерий определяли по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл культуральной жидкости (титр клеток).

Титр бактериальной суспензии определяли методом посева на питательные среды. Для этого на поверхность агаризованной питательной среды в чашки Петри стерильной пипеткой наносили 0,1 мл соответствующего разведения микроорганизмов. После посева чашки Петри помещали в термостат крышками вниз. Подсчет выросших колоний осуществляли через 3-5 суток. Полученные данные подставляли в формулу:

$$M = A \times 10^n \div V,$$

где M - количество клеток в 1 мл; A - среднее количество колоний при высеве из данного разведения; V - объем суспензии в мл, взятой для посева; 10 - коэффициент разведения; n - порядковый номер разведения [11].

Для определения оптимального источника углеродного питания культуры бактерий выращивали при температуре 30 °С и кислотности среды рН 6,7-7,0. Источниками углеродного питания служили глюкоза (1,0%), лактоза (1,0%), водорастворимая натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ 2,0%) и пшеничная солома (2,0%). Бактерии выращивали в термостатируемом шейкере при 180 об/мин и температуре 30°С, длительность культивирования составляла 96 часов.

Для определения целлюлазной активности бактерий использовали чашечный метод, основанный на способности красителя конго-рот образовывать нерастворимый комплекс с целлюлозой. В агаризованной среде пробивали лунки, в которые вносили 0,1 мл двухсуточной культуральной жидкости бактерий с титром 1×10^8 кл/мл. Чашки Петри инкубировали на протяжении 24 часов в термостате при 30°С. После чего среду окрашивали 1% раствором конго-рот, выдерживали 15 минут и смывали 1 М раствором NaCl. В качестве контроля в лунки вносили стерильную среду. Целлюлазную активность бактерий определяли по диаметру зон гидролиза (зона просветления) агаризованной среды с 0,1% Na-КМЦ и выражали ее в ед/мл. [12,13]. Общую целлюлазную активность определяли методом Мандельс-Вебера [14].

Биомассу микроорганизмов определяли нефелометрически на спектрофотометре PD-303 ("ApeI", Japan), выражали в единицах оптической плотности (отн. ед. ОП) и пересчитывали по калибровочной кривой на вес абсолютно сухой биомассы (АСБ, г/л).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 10.0» [15].

Результаты и обсуждения

Для выращивания микроорганизмов в производственных условиях необходимо провести подбор питательных сред культивирования исходя из их потребностей в питательных веществах. Эти вещества должны обеспечивать активный рост микроорганизмов и высокое накопление биомассы. Кроме того, питательные среды для культивирования микроорганизмов должны способствовать синтезу биологически активных веществ, таких как ферменты, витамины и антибиотики.

Подбор источников питания проводился по следующим параметрам: накопление биомассы и активность ферментов целлюлаз. Целлюлазная активность бактерий является одним из основных индикаторов при разработке биоудобрения на основе целлюлолитических бактерий для повышения всхожести семян кормо-бобовых культур. Ферменты-целлюлазы частично разрушают твердую оболочку семян, облегчая их прорастание, и, тем самым, повышая всхожесть.

Для подбора источников углеродного питания для бактерий использовали питательную среду Гетчинсона с глюкозой, лактозой, Na-КМЦ и пшеничной соломой. Бактерии выращивали в термостатируемом шейкере, после окончания культивирования определяли накопление биомассы и активность целлюлаз. Биомассу бактерий выражали в г/л абсолютно сухой биомассы (АСБ).

Результаты по накоплению биомассы бактериями при росте на разных источниках углерода представлены на рисунке.

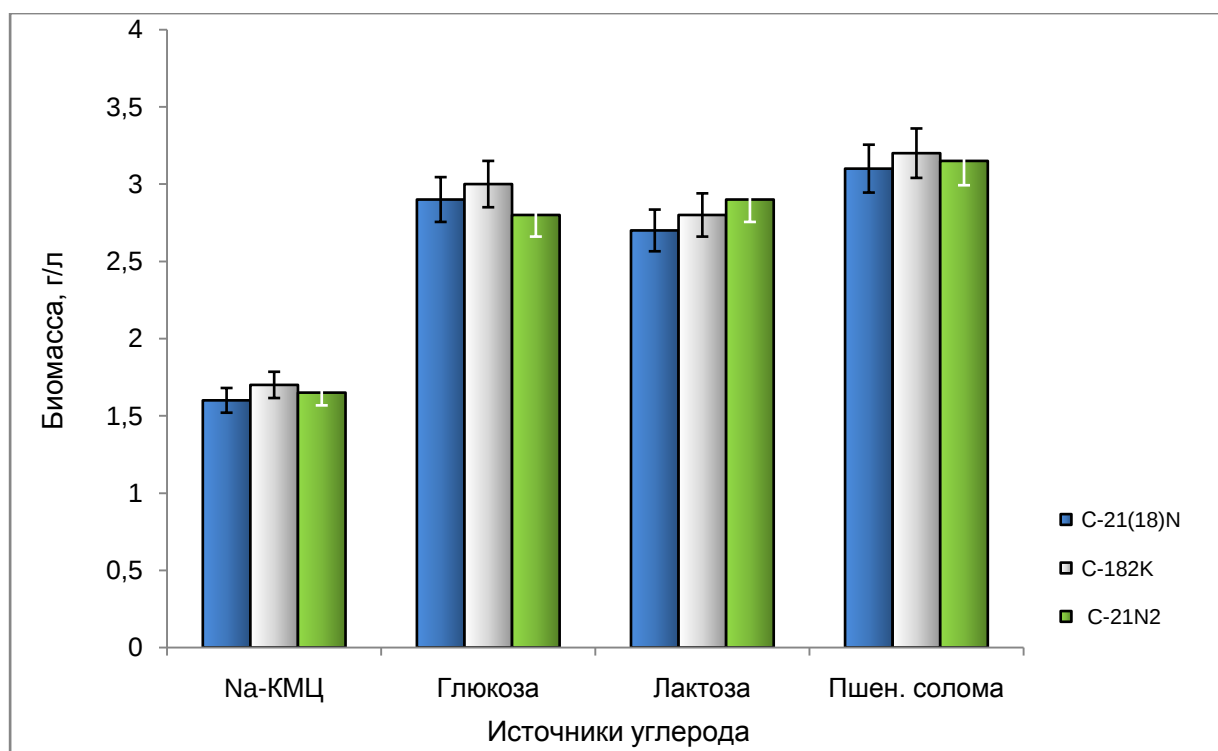


Рисунок - Накопление биомассы целлюлолитическими бактериями при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода

На рисунке видно, что максимальное накопление биомассы отмечено на питательной среде с пшеничной соломой, взятой в качестве источника углерода, и оно составляло 3,1–3,2 г/л, минимальное накопление биомассы было на питательной среде, где в качестве источника углерода использовали Na-KMЦ (1,6–1,7 г/л). Накопление биомассы на питательной среде с лактозой было несколько ниже, чем на среде с пшеничной соломой, и составляло 2,7–2,9 г/л.

Изучение влияния источников углерода на целлюлазную активность бактерий приведено в таблице.

Таблица - Целлюлазная активность бактерий при культивировании на питательных средах с разными источниками углерода

Источник углерода	Концентрация, %	Целлюлазная активность, ед/мл		
		C-21N2	C-182K	C-21(18)N
Пшеничная солома	2,0	5,4±0,01	5,4±0,03	5,5±0,01
Глюкоза	1,0	4,4±0,01	4,0±0,01	4,2±0,01
Лактоза	1,0	5,5±0,02	5,3±0,03	5,4±0,02
Na-KMЦ	2,0	4,8±0,01	4,6±0,01	4,7±0,01
Примечание - уровень доверительной вероятности $p < 0,01$				

Исследования показали (таблица), что максимальная целлюлазная активность штаммов выявлена на питательной среде с пшеничной соломой, что составило 5,4–5,5 ед/мл, минимальная - на среде с глюкозой - 4,0–4,4 ед/мл.

Установлено, что при росте бактерий на питательной среде с лактозой целлюлазная активность составляла 5,3–5,5 ед/мл и была практически равной аналогичному показателю при росте бактерий на питательной среде с пшеничной соломой (5,4–5,5 ед/мл).

Закключение

Таким образом, проведен подбор источников углеродного питания для трех наиболее перспективных штаммов целлюлолитических бактерий. Установлено, что максимальное накопление биомассы бактериями происходит на питательной среде с пшеничной соломой. Накопление биомассы на питательной среде с лактозой было несколько ниже и составляло 2,7–2,9 г/л, но активность целлюлаз при выращивании бактерий на этих источниках углерода была практически равной. Однако при наращивании биомассы бактерий в ферментерах производственного типа пшеничную солому невозможно использовать в качестве источника углерода. В связи с этим, для культивирования целлюлолитических бактерий в качестве источника углерода отобрана лактоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках грантового проекта AP08855656.

Литература:

- 1 Марченко А.Ю., Забашта Н.Н., Головки Е.Н. Сенаж из люцерны и злаково-бобовых смесей с использованием биоконсерванта «Альбит-корм» // Сельскохозяйственный журнал. - 2016. - № 9. - С. 120–123.
- 2 Папета С.И., Молдабаевой Г.С., Саган В.В., Помогаева Д.В. Люцерна, эспарцет, пырей: местные - значит, приспособленные. - URL: <https://agbz.kz/ljucerna-esparcet-pyrej-mestnye-znachit-prisposoblennye/> (дата обращения 08.04.2022).
- 3 Соболева Н. В., Бабичева И.А., Карамаев С.В., Карамаева А.С. Качество кормов из люцерны посевной и козлятника восточного // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2016. - № 5(61). - С. 103–105.
- 4 Демидас Г. И., Захлебаев М.В. Формирование густоты донника белого в однолетних и совместных посевах с однолетними зерновыми культурами // Вестник Уманского национального университета садоводства. - 2017. - № 1. - С. 53–56.
- 5 Жумадилова Ж. Ш., Идрисова Д. Т., Абдиева К.М., Таутинов И.А., Тодерич К.Н. Мелиоративная и кормовая ценность многолетних трав на засоленных почвах Казахстанского Приаралья // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2018. - № 12. - С. 287–292.
- 6 Rigal M., Rigal L., Vilarem G., Vandenbossche M.V. Sweet clovers, a source of fibers adapted for growth on wet and saline soils. Journal of Natural Fibers. 2016. Vol. 13(4). P. 410–422. <https://doi.org/10.1080/15440478.2015.1029202ff>.
- 7 Шатский И.М., Иванов И.С., Переправо Н.И., Золотарев В.Н и др. Селекция и семеноводство многолетних трав в Центрально Черноземном регионе России. - Воронеж: ОАО «Воронежская областная типография», 2016. - 236 с.
- 8 Wang X.X., Chen L.L., Zhang Y.W., Mao P.S. Determination of hard rate of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds with near infrared spectroscopy. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 2016. Vol. 36(3). P. 702–705.
- 9 Царев А.П., Царева М.А. Агробиологические основы формирования высокопродуктивных агрофитоценозов люцерны на корм и семена в Поволжье. - Саратов, 2010. - 264 с.
- 10 Игнатев С.А., Регидин А.А., Грязева Т.В., Горюнов К.Н. Динамика изменения твердосемянности сортов люцерны в зависимости от сроков хранения семян // Зерновое хозяйство России. - 2019. - № 6(66). - С.46–49. DOI: 10.31367/2079–8725-2019-66-6-46-49.

- 11 Непрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология: теория и практика. - М.: Юрайт, 2019. - 315 с.
- 12 Khoirunnisa N.S., Anwar S., Santosa D.A. Isolation and selection of cellulolytic bacteria from rice straw for consortium of microbial fuel cell. Biodiversitas. 2020. Vol. 21. P.1686-1696. DOI: 10.13057/biodiv/d210450.
- 13 Толченов А. А., Зубов Д. В., Сергеева А. В. Программные системы: теория и приложения. - Переславль-Залесский: Наука, 2009. - 216 с.
- 14 Mandels M., Weber W. The production of cellulose. Advances in Chemistry Series. 1996. Vol. 112. P. 395-434.
- 15 Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10. - М.: Stat Soft, 2013. - 268 с.

И.Э. СМЕРНОВА^{1*}, Ш.А. БАБАЕВА², Э.Р. ФАЙЗУЛИНА¹,
Л.Г. ТАТАРКИНА¹, Г.А. СПАНКУЛОВА¹

¹«Микробиология и вирусология ғылыми-зерттеу орталығы» ЖШС, Алматы,
Қазақстан

²Әзербайжан Ұлттық ғылым академиясының Микробиология институты, Баку,
Әзірбайжан

*e-mail.ru: iesmirnova@mail.ru

ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАРДЫ ӨСІРУ ҮШІН КӨМІРТЕКТІ АЗЫҚ КӨЗІН ТАҢДАУ

Түйін

Қазақстандағы негізгі азықтық және бұршақ дақылдары жоңышқа мен тәтті беде, бірақ оларды өсіргенде тұқымның өнгіштігінің төмендігі мәселесі туындайды. Бұл дақылдардың өнгіштігі мен өнімділігін арттыру үшін целлюлолитикалық бактерияларды қолдануға негізделген биологиялық әдісті қолдану ең перспективалы болып табылады. Осы бактериялар негізінде биотыңайтқышты жасау үшін оларды өндірудің жоғары рентабельділігі қажет. Шығындарды азайту жолдарының бірі бактериялық биомассаның шығымдылығын арттыру үшін оңтайлы тамақ көздерін таңдау болып табылады. Бұл зерттеудің мақсаты целлюлолитикалық бактерияларды өсіру үшін оңтайлы көміртегі көзін таңдау және целлюлоза ферменттерінің жоғары белсенділігі бар биомассаның жоғары шығымдылығын алу болды. Целлюлолитикалық бактериялардың үш штаммы үшін көміртегімен қоректену көздерін таңдау жүргізілді. Бактериялық биомассаның максималды жинақталуы бидай сабаны бар ортада байқалғаны анықталды. Лактозасы бар ортада биомассаның жинақталуы біршама төмен болды және 2,7-2,9 г/л құрады, бірақ осы көміртек көздерінде бактерияларды өсіру кезіндегі целлюлазалардың белсенділігі бірдей дерлік болды. Алайда өндірістік типтегі ферментаторларда бактериялардың биомассасын ұлғайту кезінде бидай сабанын көміртегі көзі ретінде пайдалануға болмайды. Сондықтан целлюлолитикалық бактерияларды өсіру үшін көміртегі көзі ретінде лактоза таңдалды.

Кілтті сөздер: целлюлолитикалық бактериялар, өсіру, көміртек көздері, целлюлаза белсенділігі, лактоза.

IRSTI: 34.27.17

I.E. SMIRNOVA^{1*}, Sh.A. BABAEVA², E.R. FAYZULINA¹,
L.G. TATARKINA¹, G.A. SPANKULOV¹

¹ LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Almaty

² Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku, Azerbaijan

*e-mail.ru: iesmirnova@mail.ru

SELECTION OF CARBON FEED SOURCES FOR CULTIVATION OF CELLULOLYTIC BACTERIA

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.06

Summary

The main fodder and legume crops in Kazakhstan are alfalfa and sweet clover, but when growing them, there is a problem of low seed germination. To increase the germination and productivity of these crops, the most promising is the use of a biological method based on the use of cellulolytic bacteria. To create a biofertilizer based on these bacteria, a high profitability of its production is required. One of the ways to reduce the cost of fertilizer production is the selection of optimal nutrition sources to increase the yield of bacterial biomass. The purpose of this study was to select the optimal carbon source for the cultivation of cellulolytic bacteria and to obtain an increased yield of biomass with a high activity of cellulase enzymes. The selection of sources of carbon nutrition for three strains of cellulolytic bacteria was carried out. It was established that the maximum accumulation of bacterial biomass was noted on the medium with wheat straw. The accumulation of biomass on the medium with lactose was somewhat lower and amounted to 2.7-2.9 g/l, but the activity of cellulases when growing bacteria on these carbon sources was almost equal. However, when increasing the biomass of bacteria in production-type fermenters, wheat straw cannot be used as a carbon source. Therefore, for the cultivation of cellulolytic bacteria, lactose was selected as a carbon source.

Keywords: cellulolytic bacteria, cultivation, carbon sources, cellulase activity, lactose

The main forage and legume crops in Kazakhstan are alfalfa and sweet clover. Alfalfa is the world's leading fodder crop; it is used both for feeding freshly cut green mass and for harvesting silage and haylage [1]. The culture is distinguished by longevity, multi-cutting and gives a high yield of green mass. Alfalfa feed is a source of vegetable protein and fiber, contains calcium, potassium, beta-carotene, vitamin K, B vitamins, as well as micro and macro elements, and other useful substances for animals [2,3].

An equally important crop is the sweet clover, which is not widely used in the fodder production of Kazakhstan. This is a high-yielding fodder crop, which is not inferior to alfalfa in terms of nutritional value. The advantage of sweet clover is its high ecological plasticity, it grows well on saline and infertile soils, has a number of valuable agrobiological properties, such as high protein content, ability to fix nitrogen, drought resistance, winter hardiness and early maturity. Also, when growing sweet clover, due to the decomposition of the root mass in the soil, the humus content increases. It has been established that more than 2 t/ha of active humus is formed from the plant mass of sweet clover in the soil [4]. Also, sweet clover is a phytomeliorant and promotes soil desalination, which is extremely important for the soils of Kazakhstan [5,6].

When growing sweet clover and alfalfa, there is a problem of low seed germination. This is due to the fact that some of the seeds of these crops have a dense and hard shell that prevents their germination; such seeds are called hard stone [7,8]. Fields sown with sweet clover and alfalfa often remain 1/4 empty, since only 30–40% of the sown seeds germinate, and in some

regions less than 15–20% of the seeds, which leads to sparse sowing and a decrease in crop yields [9, ten].

There are various ways to increase the germination of seeds, the most commonly used is mechanical scarification, based on the use of special scarifying machines that destroy the hard shell of seeds. However, when using mechanical scarification, damage occurs not only to the shell, but also to the seed embryo, which leads to mold and decay of the seeds, and the death of seedlings. Also, scarification requires significant material and energy costs.

In this regard, the development of methods for increasing the germination and yield of fodder legumes based on the use of biological methods is of high relevance. Cellulolytic bacteria are most suitable for developing a biological method for increasing germination. These bacteria synthesize special enzymes - cellulases, which partially destroy the hard seed coat, make it less dense and the seed sprout germinates easily. This process replaces the process of mechanical seed scarification.

When creating a biofertilizer, an important factor is the profitability of its production. One of the ways to reduce the cost of biofertilizer production is the selection of optimal food sources to increase the yield of bacterial biomass per unit of spent carbon substrate.

The nutrient medium for the cultivation of cellulolytic bacteria is the Hutchinson elective medium, in which the source of carbon is wheat straw. When increasing the biomass of bacteria in production-type fermenters, this carbon source cannot be used; therefore, a selection of carbon nutrition sources was carried out. The purpose of this study was to select the optimal carbon source for the cultivation of cellulolytic bacteria and to obtain an increased biomass yield of these bacteria with a high activity of cellulase enzymes.

Materials and methods

Three selected strains of cellulolytic bacteria (C-21(18)N, C-182K and C-21N2) served as the object of research, which showed the highest results in laboratory and field experiments.

The cultivation of microorganisms was carried out on the elective liquid nutrient medium of Getchinson by the deep method on a shaker with a rotation speed of 180 rpm in Erlenmeyer flasks (750 ml) with a medium volume of 250 ml. The optimal parameters for cultivating bacteria were determined by the number of colony forming units (CFU) in 1.0 ml of culture fluid (cell titer).

The titer of the bacterial suspension was determined by seeding on nutrient media. To do this, 0.1 ml of the appropriate dilution of microorganisms was applied to the surface of the agar nutrient medium in Petri dishes with a sterile pipette. After inoculation, the dishes were placed in a thermostat with the lids down. The colony growth was counted after 3-5 days. The data obtained were substituted into the formula:

$$M = A \times 10n \div V,$$

where M is the number of cells in 1 ml; A - the average number of colonies when seeded from a given dilution; V is the volume of the suspension in ml, taken for inoculation; 10 - dilution factor; n is the serial number of dilution [11].

To determine the optimal source of carbon nutrition, bacterial cultures were grown at a temperature of 30°C and pH 6.7-7.0. Glucose (1.0%), lactose (1.0%), water-soluble sodium carboxymethylcellulose (Na-CMC 2.0%) and wheat straw (2.0%) served as sources of carbon nutrition. The bacteria were grown in a thermostatically controlled shaker at 180 rpm and a temperature of 30°C, the duration of cultivation was 96 hours.

To determine the cellulase activity of bacteria and identify effective strains, a plate method was used, based on the ability of the Congo-rot dye to form an insoluble complex with cellulose. Wells were punched in an agar medium, into which 0.1 ml of a two-day culture liquid

of the studied bacterial strains with a titer of 1×10^8 cells/ml was added. Petri dishes were incubated for 24 hours in a thermostat at 30°C.

After that, the medium was stained with 1% Congo-rot solution, kept for 15 minutes, and washed off with 1 M NaCl solution. Cellulase activity was assessed by the diameter of the cellulose hydrolysis zone (clearance) around the wells. As a control, sterile medium was instilled into the wells. The cellulase activity of bacteria was determined by the diameter of the zones of hydrolysis of the agar medium with 0.1% Na-CMC and expressed in U/ml. [12,13].

The total cellulase activity was determined by the Mandels-Weber method [14].

The biomass of microorganisms was determined nephelometrically on a PD-303 spectrophotometer (Apel, Japan), expressed in units of optical density (rel. OD units), and recalculated according to the calibration curve to the weight of absolutely dry biomass (ASB, g/L).

Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 10.0 software package [15].

Results and discussions

For the cultivation of microorganisms in industrial conditions, it is necessary to select culture media based on their nutrient requirements. These substances must ensure the active growth of microorganisms and a high accumulation of biomass. In addition, nutrient media for cultivating microorganisms should promote the synthesis of biologically active substances, such as enzymes, vitamins, and antibiotics.

The selection of food sources was carried out according to the following parameters: accumulation of biomass and activity of cellulase enzymes. The cellulase activity of bacteria is one of the main indicators in the development of biofertilizer based on bacteria to increase the germination of seeds of fodder legumes. Since, it is these enzymes that partially destroy the hard shell of seeds, make it easier for germination, and, thereby, increase their germination.

To select sources of carbon nutrition for bacteria, Hutchinson's medium with glucose, lactose, Na-CMC, and wheat straw was used. Bacteria were grown in a thermostatically controlled shaker; after bacterial cultivation, biomass accumulation and cellulase activity were determined. Bacterial biomass was expressed in g/l absolutely dry biomass (ADB).

The results on the accumulation of biomass by bacteria on different carbon sources are shown in the figure.

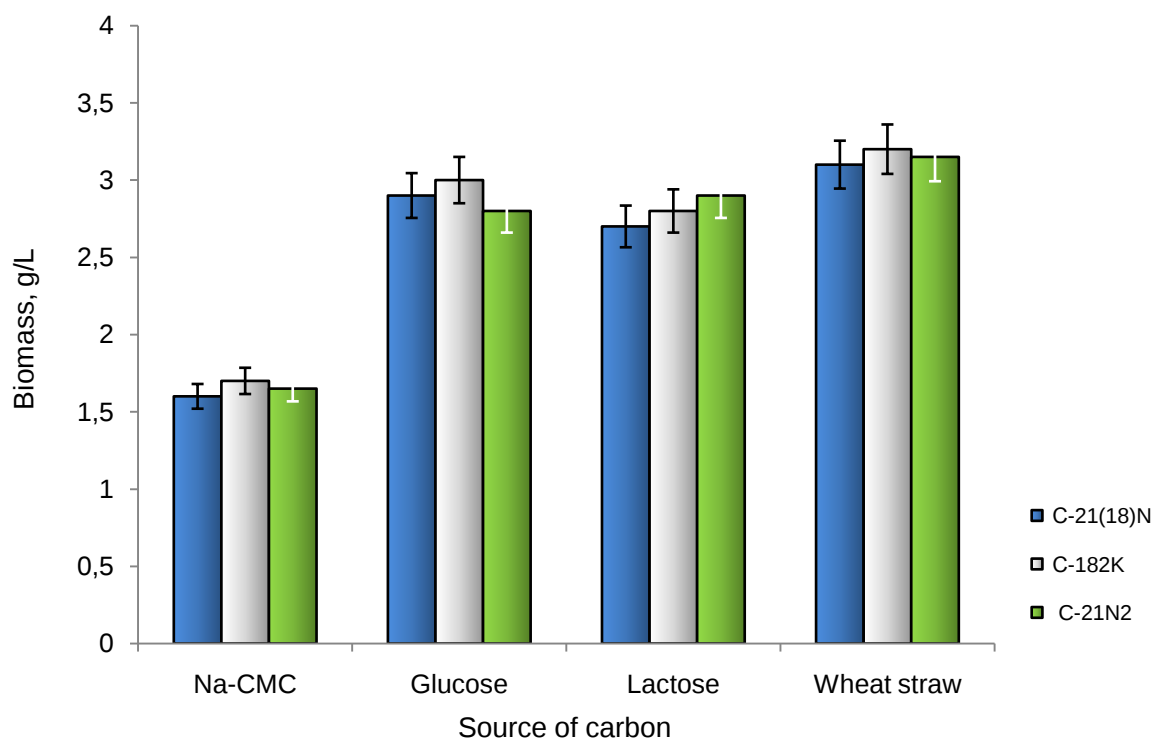


Figure - Accumulation of biomass by cellulolytic bacteria during cultivation on media with different carbon sources

The figure clearly shows that the maximum accumulation of biomass by bacteria was noted on the medium with wheat straw, taken as a carbon source, and it was 3.1-3.2 g/l, the minimum accumulation of biomass was on the medium with Na-CMC (1, 6-1.7 g/l). The accumulation of biomass on the medium with lactose was somewhat lower than on the medium with wheat straw, and amounted to 2.7-2.9 g/L.

The study of the influence of carbon sources on the cellulase activity of bacteria is given in the table.

Table - Cellulase activity of bacteria during cultivation on media with different carbon sources

Source of carbon	Concentration, %	Cellulase activity, U/ml		
		C-21N2	C-182K	C-21(18)N
Wheat straw	2,0	5,4±0,01	5,4±0,03	5,5±0,01
Glucose	1,0	4,4±0,01	4,0±0,01	4,2±0,01
Lactose	1,0	5,5±0,02	5,3±0,03	5,4±0,02
Na-CMC	2,0	4,8±0,01	4,6±0,01	4,7±0,01
Note - confidence level $p < 0.01$				

Studies have shown (table) that the maximum total cellulase activity of the strains was noted on the medium with wheat straw and it was 5.4-5.5 U/ml, the minimum on the medium with glucose was 4.0-4.4 U/ml.

It was found that during the growth of bacteria on a medium with lactose, their cellulase activity was 5.3-5.5 U/ml and was almost equal to that of the growth of bacteria on a medium with wheat straw (5.4-5.5 U/ml).

Conclusion

Thus, the selection of sources of carbon nutrition for three strains of cellulolytic bacteria was carried out. It was established that the maximum accumulation of biomass by bacteria was noted on a medium with wheat straw. The accumulation of biomass on the medium with lactose was somewhat lower and amounted to 2.7-2.9 g/l, but the activity of cellulases when growing bacteria on these carbon sources was almost equal. However, when increasing the biomass of bacteria in production-type fermenters, wheat straw cannot be used as a carbon source. Therefore, for the cultivation of cellulolytic bacteria, lactose was selected as a carbon source.

The study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the grant project AP08855656.

References:

- 1 Marchenko A.YU., Zabashta N.N., Golovko E.N. Senazh iz lyucerny i zlakovo-bobovyh smesej s ispol'zovaniem biokonservanta «Al'bit-korm». Sel'skohozyajstvennyj zhurnal. 2016. № 9. S. 120–123.
- 2 Papeta S.I., Moldabaev G.S., Sagan V.V., Pomogaeva D.V. Lyucerna, esparcet, pyrej: mestnye - znachit, prispособlennye. URL: <https://agbz.kz/ljucerna-esparcet-pyrej-mestnye-znachit-prispособlennye/> (data obrashcheniya 08.04.2022).
- 3 Soboleva N.V., Babicheva I.A., Karamaev S.V., Karamaeva A.S. Kachestvo kormov iz lyucerny posevnoj i kozlyatnika vostochnogo. Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2016. № 5(61). S. 103-105.
- 4 Demidas G.I., Zahlebaev M.V. Formirovanie gustoty donnika belogo v odnoletnih i sovместimyh posevah s odnoletnimi zernovymi kul'turami. Vestnik Umanskogo nacional'nogo universiteta sadovodstva. 2017. № 1. S. 53-56.
- 5 ZHumadilova ZH.SH., Idrisova D.T., Abdieva K.M., Tautenov I.A., Toderich K.N. Meliorativnaya i kormovaya cennost' mnogoletnih trav na zasolennyh pochvah Kazahstanskogo Priaral'ya // Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij. 2018. № 12. S. 287-292.
- 6 Rigal M., Rigal L., Vilarem G., Vandenbossche M.V. Sweet clovers, a source of fibers adapted for growth on wet and saline soils. Journal of Natural Fibers. 2016. Vol. 13(4). R. 410-422. <https://doi:10.1080/15440478.2015.1029202ff>.
- 7 SHatskij I.M., Ivanov I.S., Perepravo N.I., Zolotarev V.N i dr. Selekcija i semenovodstvo mnogoletnih trav v Central'no CHernozemnom regione Rossii. Voronezh: OAO «Voronezhskaya oblastnaya tipografiya», 2016. 236 s.
- 8 Wang X.X., Chen L.L., Zhang Y.W., Mao P.S. Determination of hard rate of alfalfa (Medicago sativa L.) seeds with near infrared spectroscopy. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 2016. Vol. 36(3). R. 702-705.
- 9 Carev A.P., Careva M.A. Agrobiologicheskie osnovy formirovaniya vysokoproduktivnyh agrofitocenozov lyucerny na korm i semena v Povolzh'e. Saratov, 2010. 264 c.
- 10 Ignat'ev S.A., Regidin A.A., Gryazeva T.V., Goryunov K.N. Dinamika izmeneniya tverdosemyannosti sortov lyucerny v zavisimosti ot srokov hraneniya semyan. Zernovoe hozyajstvo Rossii. 2019. № 6(66). S.46-49. DOI: 10.31367/2079-8725-2019-66-6-46-49.
- 11 Netrusov A.I., Kotova I.B. Mikrobiologiya: teoriya i praktika. M.: YUrajt, 2019. 315 s.
- 12 Khoirunnisa N.S., Anwar S., Santosa D.A. Isolation and selection of cellulolytic bacteria from rice straw for consortium of microbial fuel cell. Biodiversitas. 2020. Vol. 21. P.1686-1696. DOI: 10.13057/biodiv/d210450.
- 13 Tolchenov A. A., Zubov D. V., Sergeeva A. V. Programmnye sistemy: teoriya i prilozheniya. - Pereslavl'-Zalesskij: Nauka, 2009. 216 s.

14 Mandels M., Weber W. The production of cellulose. Advances in Chemistry Series. 1996. Vol. 112. P. 395-434.

15 Borovikov V.P. Populyarnoe vvedenie v sovremennyj analiz dannyh v sisteme STATISTICA 10. M.: Stat Soft, 2013. 268 s.

МРНТИ: 62.09.39

О.Н. ШЕМШУРА*, А.И. БАЙДАЛИНОВ, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА, Г.Т. ДЖАКИБАЕВА,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА, Г.А. МОМБЕКОВА

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

*e-mail: olgashemshura@mail.ru

ШТАММ *CHRYSEOBACTERIUM RHIZOPLANAE* 1М – ОСНОВА БИОПРЕПАРАТА ПРОТИВ ФУЗАРИОЗНОЙ ГНИЛИ *VIGNA RADIATA* И ОЦЕНКА ЕГО БИОБЕЗОПАСНОСТИ

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.07

Аннотация

В статье приведены результаты исследования фунгицидной активности штамма *Chryseobacterium rhizoplane* 1М и его метаболитов, ацетоина и 2,3-бутанедиола, в отношении возбудителей фузариоза маша (*Vigna radiata*). Установлено, что диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* штаммом *C. rhizoplane* 1М составил 22,3±2,0; 25±0,36 и 27,3±2,5 мм, соответственно. Снижение роста патогенов под действием его метаболитов, ацетоина и 2,3-бутанедиола, было наибольшим при концентрации 500 мг/мл. Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* в варианте с ацетоином с концентрацией 500 мг/л составил 19,0; 11,7 и 13,7 мм, соответственно. Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* в варианте с 2,3-бутанедиолом с концентрацией 500 мг/л составил 14,3; 21,0 и 11,3 мм, соответственно.

Оценка факторов патогенности (токсичности) и аллергенности штамма *Chryseobacterium rhizoplane* 1М показала его безопасность, а установленная ранее ростостимулирующая активность штамма и его метаболитов в отношении проростков маша свидетельствует о перспективности его применения в качестве основы для создания полифункционального биопрепарата, обладающего комплексным противогрибковым и стимулирующим действием.

Ключевые слова: *Vigna radiata*, фузариоз, *Chryseobacterium rhizoplane*, биопрепарат, биобезопасность.

Маш (*Vigna radiata*), как и другие зернобобовые культуры, имеет большое агротехническое значение, как предшественник для многих сельскохозяйственных культур, обогащая почву биологическим азотом. В бобах маша содержится полный комплекс полезных веществ: жиры и углеводы, витамины и минеральные вещества, клетчатка, пищевые волокна. Значительные потери посевам маша наносят различные болезни, из которых наиболее широко распространенной и опасной является фузариоз [1-5]. У растений, пораженных фузариозом, начинается загнивание корней — появляются участки красновато-бурого оттенка, покрытые белым или бело-розовым налетом. Затем поражаются сосуды, обеспечивающие ткани необходимой влагой. Происходит закупорка сосудов мицелием гриба, выброс токсических веществ, вследствие чего нарушается водный обмен и работа фотосинтеза.

Характерными признаками поражения фузариозом считаются пожелтение и опадание листьев, поникшие верхушки растений, потемневшие корни. У молодых

растений симптомы заражения проявляются не так выраженно, только замедлением роста и развития, тогда как на более поздних стадиях, усугубленных повышенной температурой окружающего воздуха и хроническим недостатком воды, фузариоз развивается стремительными темпами и гибель растений происходит за несколько дней.

В настоящее время использование агрохимикатов в сельском хозяйстве является основным способом контроля болезней растений, однако их применение имеет ряд недостатков: происходит формирование стойких рас возбудителей, ингибирование ризосферных микроорганизмов, опасность для здоровья человека и животных. В связи с этим, возникает необходимость замены их на нетоксичные и экологически безопасные биопрепараты на основе микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью [6-9].

Ранее нами из корневых узелков маша (*Vigna radiata*), культивируемого в Туркестанском районе Казахстана, был выделен штамм *Chryseobacterium rhizoplane* 1М, который стимулировал рост маша и синтезировал ряд соединений, обладающих ростостимулирующей активностью [10].

В связи с возможностью создания полифункционального биопрепарата, обладающего комплексным фунгицидным действием на фитопатогены и стимулирующим на растение, целью исследования явилось изучение антагонистической активности штамма *C. rhizoplane* 1М и определение степени его безопасности для дальнейшей разработки на его основе биопрепарата.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служил штамм *Chryseobacterium rhizoplane* 1М. Исследование антагонистической активности штамма в отношении фитопатогенов–возбудителей фузариоза проводили в лабораторных условиях методом диффузии в агар [11]. Штамм культивировался в течение 24 часов на круговой качалке 180 об/мин на жидкой питательной среде Мазе следующего состава (г/л): горох-100, сахара -10, HPO_4 – 1, MgSO_4 – 0,03, агар – 20, вода дистиллированная –1. Титр получаемой бактериальной суспензии составляет 10^8 КОЕ/мл. В качестве тест-культур использовали *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti* и *Fusarium tricinctum*, выделенные из пораженных семян маша сорта «Победа-54» Фитопатогенные грибы засеивали сплошным газоном на твердую картофельно-глюкозную среду в чашки Петри. На свежезасеянном газоне фитопатогена в стерильных условиях делали лунки, в которые вносили бактериальную суспензию штамма *C. rhizoplane*, или выделенные ранее из культуральной жидкости ацетон и 2,3-бутанедиол в концентрациях 250 и 500 мг/л. В качестве контроля использовали питательную среду Мазе и 96% этанол. Чашки Петри помещали в термостат при 28°C на 3-5 суток (время роста патогена). Об антагонистической активности штамма судили по отсутствию роста патогена вокруг лунки со штаммом *C. rhizoplane* 1М или ацетона и 2,3-бутанедиола.

Оценку безопасности штамма исследовали на лабораторных животных: нелинейных белых мышах, морских свинках, кроликах, полученных из питомника лабораторных животных с ветеринарными паспортами здоровья.

Исследование вирулентности штамма проводилось на 8 группах животных (по 8 белых мышей весом 16-18 г) в концентрациях от 10^3 до 10^{11} КОЕ/мл общепринятым методом [12] путем перорального и внутрибрюшинного введения различных концентраций суспензии бактерий. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Животных содержали в одинаковых условиях, кормили одинаковым рационом. Наблюдения за их состоянием проводили в течение 15 суток.

Исследование аллергенного действия по сенсибилизирующему эффекту проводили на морских свинках в количестве 3 голов, которым на выстриженные участки кожного

покрова наносили путем аппликации исследуемую культуру в концентрациях от 10^3 до 10^6 КОЕ/мл. Контролем служил физиологический раствор. Учет реакции проводился через 24 часа в течение 7 дней. Результат оценивали в баллах по следующей шкале:

- 0 - видимой реакции нет;
- 1 - бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 2 - ярко-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 3 - красная эритема по всему участку;
- 4 - инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;
- 5 - эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Для исследования местно-раздражающего действия в опыте использовали трех кроликов весом 3–3,5 кг, которым в конъюнктивальную полость правого глаза закапывали исследуемое вещество в концентрации 1×10^9 КОЕ/мл. Левый глаз был контрольным, в него закапывали дистиллированную воду. Исследования проводили по бальной системе, исходя из суммарного балла по следующим критериям: гиперемия конъюнктивы и роговицы, отёк век, выделения. Учёт реакции проводился через 24 часа в течение 5 дней.

Заключение о классе опасности культуры *C. rhizoplane* 1М делали согласно существующей классификации патогенности штаммов [13].

Все полученные экспериментальные данные статистически обработаны с использованием Программы «STATISTICA 10».

Результаты и обсуждение

Биологический метод считается экологически безопасным и является неотъемлемой частью интегрированной системы защиты растений. Штаммы микроорганизмов, подавляющие рост и развитие фитопатогенных грибов, являются основой для создания биопрепаратов. Нами проведено исследование антагонистической активности штамма *C. rhizoplane* 1М в отношении возбудителей фузариоза маша, которое показало, что данный штамм подавляет развитие *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum*, выделенных из пораженных семян маша. Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* штаммом *C. rhizoplane* 1М составил $22,3 \pm 2,0$; $25 \pm 0,36$ и $27,3 \pm 2,5$ мм, соответственно (таблица 1).

Таблица 1 - Антагонистическая активность штамма *C. rhizoplane* 1М в отношении возбудителей фузариозной гнили маша

Тест – микроорганизм	Диаметр зон подавления роста тест-микроорганизма, мм
<i>Fusarium oxysporum</i>	$22,3 \pm 2,0$
<i>Fusarium equiseti</i>	$25 \pm 0,36$
<i>Fusarium tricinctum</i>	$27,3 \pm 2,5$
Контроль – питательная среда Мазе	0

Ранее было установлено, что метаболитами штамма *C. rhizoplane* 1М являются ацетоин и 2,3-бутанедиол, содержание которых в культуральной жидкости составляло $78,5 \pm 2,0\%$ и $16,6 \pm 2,9\%$, соответственно [9]. Эти соединения протестированы на антагонистическую активность в отношении возбудителей фузариоза: *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* (таблица 2).

Таблица 2 - Антагонистическая активность ацетоина и 2,3-бутанедиола в отношении возбудителей фузариозной гнили маша

Образец	Концентрация, мг/л	Диаметр зон подавления роста тест-микроорганизма, мм		
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>
ацетоин	500	19,0±1,0	11,7±2,8	13,7±1,5
	250	6,3±1,5	7,7±1,5	6,0±1,0
2,3-бутанедиол	500	14,3±3,7	21,0±3,6	11,3±2,3
	250	6,7±2,8	13,3±2,8	7,3
Контроль 96% этанол		0	0	0
Контроль вода		0	0	0

Известно, что летучие соединения, такие как алканы, альдегиды, аммиак, сложные эфиры, кетоны, сульфиды и терпеноиды, продуцируемые некоторыми ризобактериями, проявляют противогрибковую активность в отношении фитопатогенов, в том числе против *F. oxysporum* и *R. solani*. В нашем исследовании наблюдалось снижение роста возбудителей фузариоза в присутствии ацетоина и 2,3-бутанедиола (таблица 2). При этом концентрация 500 мг/л обоих веществ оказалась более эффективной. Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* в варианте с ацетином с концентрацией 500 мг/л составил 19,0, 11,7 и 13,7 мм, соответственно. Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* в варианте с 2,3-бутанедиолом с концентрацией 500 мг/л составил 14,3, 21,0 и 11,3 мм, соответственно.

Исходя из полученных данных, штамм *C. rhizoplanae* 1М является перспективным в качестве основы для создания биопрепарата для стимуляции роста маша (*Vigna radiate*) и защиты от фузариоза. Для дальнейшей разработки и применения на основе штамма биопрепарата необходимо оценить его биобезопасность для окружающей среды. В связи с этим, нами проведена оценка факторов патогенности (токсичности) и аллергенности штамма. Исследование вирулентности штамма показало, что при внутрибрюшинном введении суспензии штамма *C. rhizoplanae* 1М в концентрациях от 10^3 до 10^7 КОЕ/мл животные были здоровы, наблюдался хороший аппетит, подвижность. При концентрации 10^9 и 10^{11} КОЕ/мл двое животных заболели. При пероральном введении штамма *C. rhizoplanae* 1М, через 2 суток отмечена заболеваемость одного животного в варианте с концентрацией 10^9 КОЕ/мл, и двоих животных - в варианте с концентрацией 10^{11} КОЕ/мл. У заболевших животных наблюдалось уменьшение аппетита и подвижности, взъерошенность меха. На 5 сутки животные выздоровели. На 15 сутки гибели переболевших животных не отмечено (таблица 3).

Таблица 3 - Результаты исследования острой токсичности культуры *C. rhizoplanae* при внутрибрюшинном и пероральном введении мышам

Кол-во животных	Способ введения	Концентрация <i>C. Rhizoplanae</i> (КОЕ/мл)	Заболело животных	Летальность животных	Кол-во выживших животных
1	2	3	4	5	6
8	В/брюш	10^3	0	0	8±0
8	В/брюш	10^5	0	0	8±0

Продолжение таблицы-3					
1	2	3	4	5	6
8	В/брюш	10^7	0	0	8 ± 0
8	В/брюш	10^9	2 ± 0	0	8 ± 0
8	В/брюш	10^{11}	2 ± 0	0	8 ± 0
8	В/брюш	Контроль Физ.р-р.	0	0	8 ± 0
8	Перор.	10^3	0	0	8 ± 0
8	Перор.	10^5	0	0	8 ± 0
8	Перор.	10^7	0	0	8 ± 0
8	Перор.	10^9	1 ± 0	0	8 ± 0
8	Перор.	10^{11}	2 ± 0	0	8 ± 0
8	Перор.	Контроль Физ.р-р.	0	0	8 ± 0
Примечание: В/брюш – внутрибрюшинное введение; Перор. – пероральное введение; Физ.р-р. – физиологический раствор.					

При исследовании аллергенного действия наблюдалась бледно-розовая эритема у испытуемых морских свинок по месту наложения на их кожу аппликацию штамма *C. rhizoplanae* 1М, при концентрации 10^6 КОЕ/мл, что свидетельствовало о слабом аллергенном действии, которое прошло на вторые сутки после наложения.

При введении исследуемой культуры в конъюнктиву глаза кроликов, у одного из трех наблюдалась слабая положительная реакция в виде инъекции сосудов склеры и роговицы, слизистых выделений в углах глаз. На вторые сутки наблюдений вышеназванные явления у животных полностью купировались, в последующие 5 суток отклонений от физиологической нормы не наблюдалось, соответственно, исследуемый штамм не обладает местно-раздражающим действием.

Основываясь на существующей классификации определения факторов патогенности (токсичности) и аллергенности штаммов, культура *C. rhizoplanae* 1М принадлежит к 4-классу опасности, и не является патогенной для теплокровных организмов.

Таким образом установлено, что штамм *C. rhizoplanae* 1М, и его метаболиты, ацетоин и 2,3-бутанедиол, обладают фунгицидным действием в отношении возбудителей фузариоза маша (*Vigna radiata*). Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* штаммом *C. rhizoplanae* 1М составил $22,3 \pm 2,0$, $25 \pm 0,36$ и $27,3 \pm 2,5$ мм, соответственно. Снижение роста патогенов под действием его метаболитов, ацетоина и 2,3-бутанедиола, было наибольшим при концентрации 500 мг/мл. Диаметр зон подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* в варианте с ацетоином с концентрацией 500 мг/л составил 19,0, 11,7 и 13,7 мм, соответственно. Диаметр зон

подавления роста *F. oxysporum*, *F. equiseti* и *F. tricinctum* в варианте с 2,3-бутанедиолом с концентрацией 500 мг/л составил 14,3, 21,0 и 11,3 мм, соответственно. Оценка факторов патогенности (токсичности) и аллергенности штамма показала его безопасность, а установленная ранее ростостимулирующая активность штамма и его метаболитов в отношении проростков маша свидетельствует о перспективности его применения в качестве основы для создания полифункционального биопрепарата, обладающего комплексным противогрибковым и стимулирующим действием.

Литература:

- 1 Oberai M., Khanna V. Mung bean rhizobacteria antagonist to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*// Acta scientific microbiology. -2019. -Vol. 2, No. 8. - P. 82-90.
- Sun S., Zhu L., Sun F., Duan C., Zhu Zh. Pathotype diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *mungicola* causing wilt on mungbean (*Vigna radiata*)// Crop and Pasture Science. - 2020. - Vol.71, No.10. P. 873-883. <https://doi.org/10.1071/CP20164>
- 2 Naseri B. Bean production and fusarium root rot in diverse soil environments in Iran// J. Soil Sci. Plant Nutr. -2014. -Vol.14, No.1.
- 3 Eliane Divina de Toledo-Souza, Pedro Marques da Silveira, Adalberto Corrêa Café-Filho, Murillo Lobo Junio *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system// Pesq. agropec. bras., Brasília -2012. - Vol.47, No.8. - P.1031-1037.
- 4 5. Kalantari, S., Marefat, A., Naseri, B., Hemati, R. 2011. Biocontrol of bean *Fusarium* root rot using soil microbia in Zanjan province// The First Congress of Modern Agricultural Sciences and Technologies. Zanjan University, Zanjan, Iran. – 2011. -P. 240-243.
- 5 6. Whipps J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere// *Journal of Experimental Botany*. - 2001. - Vol. 52, Issue suppl1. - P. 487–511.
- 6 7. Rodríguez-Navarro D., Oliver M., Contreras Al., Ruiz-Sainz J. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development*// Springer Verlag/EDP Sciences/INRA. - 2011. - No.31 (1). - P.173-190.
- 7 8. Bernard R. Glick Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications// Hindawi Publishing Corporation Scientica. - 2012. - Article ID 963401. - 15 pages.
- 8 9. Akhtar m. S., Shakeel U., Siddiqui Z. A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil// Turk J Biol. - 2010. - No. 4. - P. 1-7
- 9 Shemshura O.N., Shemsheeva Zh.N., Sadanov A.K., Alimzhanova M.B., Daugaliyeva S.T., Mombekova G.A., Rakhmetova Zh.K. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Chryseobacterium rhizoplaniae* isolated from *Vigna radiata*// Eco. Env. & Cons.- 2019. - No. 25(2). - P. 807-812.
- 10 Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S., Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review// J. Pharm. Anal. - 2016. - No.6. - P. 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- 11 Биргер М.О. «Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования» М.,1982.163-168 с.
- 12 Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды». - 1991 г. N 5789/1-91. – 20 с.

О.Н. ШЕМШУРА*, А.И. БАЙДАЛИНОВ, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА, Г.Т. ДЖАКИБАЕВА,
Г.Б. БАЙМАХАНОВА, Г.А. МОМБЕКОВА

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

* e-mail: olgashemshura@mail.ru

VIGNA RADIATA-ҒА ФУЗАРИОЗДЫ ШІРІГІНЕ ҚАРСЫ БИОПРЕПАРАТ НЕГІЗІ - CHRYSEOBACTERIUM RHIZOPLANAE 1М ШТАММЫ ЖӘНЕ ОНЫҢ БИОҚАУІПСІЗДІГІНІҢ БАҒАСЫ

Түйін

Мақалада *Chryseobacterium rhizoplane* 1М штаммының фунгицидтік белсенділігінің нәтижелері және метаболиттері, ацетон мен 2,3-бутанедиолдың маштың (*Vigna radiata*) фузариоз ауруының қоздырғышына қатынасы келтірілген. *F. oxysporum*, *F. equiseti* және *F. tricinctum* патогендерінің өсу диаметрлік зоналарын тежеуі *C. rhizoplane* 1М штаммымен $22,3 \pm 2,0$; $25 \pm 0,36$ және $27,3 \pm 2,5$ мм қатынасында анықталды. Патогендердің өсуінің тежелуі, оның метаболиттері ацетон және 2,3-бутанедиолдың 500 мг/мл концентрациясында айқын көрінді. *F. oxysporum*, *F. equiseti* және *F. tricinctum* өсу диаметрлік тежелуі, ацетонның 500 мг/л концентрация нұсқасында 19,0; 11,7 және 13,7 мм құрады. *F. oxysporum*, *F. equiseti* және *F. tricinctum* өсу диаметрлік тежелуі, 2,3-бутанедиолдың 500 мг/л концентрация нұсқасында 14,3; 21,0 және 11,3 мм болды.

Бағалау факторлары бойынша, *Chryseobacterium rhizoplane* 1М штаммының патогенділігі (уыттылығы) және аллергенділігі оның қауіпсіздігін, сонымен бірге бұрын анықталғандай штаммның өсу белсенділігін ынталандырушы және метаболиттерінің маш дақылына қолдану тиімділігін көрсеткендей, болашақта зерттеулерге қарсы және ынталандырушы, кешенді полифункционалды биопрепарат жасауға жарайтындығын көрсетті.

Кілтті сөздер: *Vigna radiata*, фузариоз, *Chryseobacterium rhizoplane*, биопрепарат, биоқауіпсіздік

IRSTI: 62.09.39

O.N. SHEMSHURA*, A.I. BAIDALINOV, ZH.B. SULEIMENOVA, G.T. DZHAKIBAEVA,
G.B. BAIMAKHANOVA, G.A. MOMBEKOVA

LLP “Research and Production Center for Microbiology and Virology”, Almaty,
Kazakhstan

* e-mail: olgashemshura@mail.ru

THE STRAIN CHRYSEOBACTERIUM RHIZOPLANAE 1M - A BASIS OF A BIOLOGICAL PREPARATION AGAINST FUSARIUM ROT VIGNA RADIATA AND ITS BIOSAFETY ASSESSMENT

doi: 10.53729/MV-AS.2022.02.07

Summary

The article presents the results of a study of the fungicidal activity of the *Chryseobacterium rhizoplane* 1M strain and its metabolites acetoin and 2,3-butanediol against *Fusarium* mung bean (*Vigna radiata*) pathogens. It was found that the diameter of the growth inhibition zones for *F. oxysporum*, *F. equiseti*, and *F. tricinctum* by *C. rhizoplane* 1M was 22.3 ± 2.0 , 25 ± 0.36 , and 27.3 ± 2.5 mm, respectively. The reduction in pathogen growth by its metabolites acetoin and 2,3-butanediol was

greatest at 500 mg/ml. The diameter of the zones of inhibition of growth of *F. oxysporum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* in the variant with acetoin at a concentration of 500 mg/l was 19.0, 11.7 and 13.7 mm, respectively. The diameter of the growth inhibition zones of *F. oxysporum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* in the variant with 2,3-butanediol at a concentration of 500 mg/l was 14.3, 21.0 and 11.3 mm, respectively.

Evaluation of the pathogenicity (toxicity) and allergenicity factors of the strain showed its safety, and the previously established growth-stimulating activity of the strain and its metabolites in relation to mung bean seedlings indicates its promising use as a basis for creating a polyfunctional biological product that has a complex effect on both mung bean pathogens and mung bean sprouts and stimulation of plant growth.

Key words: *Vigna radiata*, fusariosis, *Chryseobacterium rhizoplanæ*, biological product, biosafety.

Mash (*Vigna radiata*), like other leguminous crops, is of great agrotechnical importance as a precursor for many crops, enriching the soil with biological nitrogen. Mung beans contain a full range of useful substances: fats and carbohydrates, vitamins and minerals, fiber, dietary fiber. Significant losses to mung bean crops are caused by various diseases, of which *Fusarium* is the most widespread and dangerous [1-5]. In plants affected by *Fusarium*, rotting of the roots begins - areas of a reddish-brown hue appear, covered with a white or white-pink bloom. Then the vessels are affected, providing the tissues with the necessary moisture.

There is a blockage of vessels by the mycelium of the fungus, the release of toxic substances, as a result of which water exchange and photosynthesis are disrupted. Yellowing of leaves, falling off, drooping top of plants, darkened roots are considered characteristic signs of damage. In young plants, the symptoms of infection are not so pronounced, you can only notice a slowdown in growth and development. Whereas in the later stages, aggravated by elevated ambient temperature and a chronic lack of water, *Fusarium* develops at a rapid pace and the death of plants is a matter of several days.

Currently, the use of agrochemicals in agriculture is the main way to control plant diseases, but their use has several disadvantages: the formation of resistant races of pathogens, the inhibition of rhizosphere microorganisms, and the danger to human and animal health. In this regard, there is a need to replace them with non-toxic and environmentally friendly biological products based on microorganisms with antagonistic activity [6-9].

Previously, we isolated a strain of *C. rhizoplanæ* 1M from the root knots of mung bean (*Vigna radiata*) cultivated in the Turkestan region of Kazakhstan, which stimulated the growth of mung bean and synthesized a number of compounds with growth-stimulating activity [10].

In connection with the possibility of creating a polyfunctional biological product that has a complex fungicidal effect on phytopathogens and stimulates the plant, the aim of the study was to study the antagonistic activity of the *C. rhizoplanæ* 1M strain and determine the degree of its safety for further development of a biological product based on it.

Objects and methods of research

The objects of study were the *C. rhizoplanæ* 1M strain. The study of the antagonistic activity of the *C. rhizoplanæ* 1M strain against phytopathogens, causative agents of *Fusarium*, was carried out under laboratory conditions by the agar diffusion method [11]. The strain was cultivated for 24 hours on a circular shaker 180 rpm on a liquid nutrient medium Mase with the following composition (g/l): peas-100, sucrose -10, HPO₄ - 1, MgSO₄ - 0.03, agar - 20, distilled water -one. The titer of the resulting bacterial suspension is 10⁸ CFU/ml. *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, isolated from the affected seeds of Pobeda-54 mung bean variety, were used as test cultures. Phytopathogenic fungi were sown in a continuous lawn on a solid potato-glucose medium in Petri dishes. Wells were made on a freshly planted lawn of a phytopathogen under sterile conditions, into which a bacterial suspension of a *C. rhizoplanæ*

strain was added, or acetoin and 2,3-butanediol previously isolated from the culture liquid at concentrations of 250 and 500 mg/l. Maze medium and 96% ethanol were used as controls. Petri dishes were placed in a thermostat at 28°C for 3-5 days (pathogen growth time). The antagonistic activity of the strain was judged by the absence of pathogen growth around the well with the *C. rhizoplanae* 1M strain or acetoin and 2,3-butanediol.

The safety assessment of the strain was studied on laboratory animals: non-linear white mice, guinea pigs, rabbits obtained from a nursery of laboratory animals with veterinary health passports.

The study of the virulence of the strain was carried out on 8 groups of animals (8 white mice each weighing 16–18 g) at concentrations from 10^3 to 10^{11} CFU/ml by the conventional method [12] by oral and intraperitoneal administration of various concentrations of a bacterial suspension. Control animals were injected with saline. The animals were kept under the same conditions and fed the same diet. Their condition was monitored for 15 days.

The study of the allergenic effect on the sensitizing effect was carried out on guinea pigs in the amount of 3 heads, which were applied to the clipped areas of the skin by application of the studied culture in concentrations from 10^3 to 10^6 CFU/ml. Physiological saline served as control. Accounting for the reaction was carried out after 24 hours and within 7 days. The result was evaluated in points according to the following scale:

- 0 - no visible reaction;
- 1 - pale pink erythema throughout the area or along its periphery;
- 2 - bright pink erythema throughout the area or along its periphery;
- 3 - red erythema throughout the area;
- 4 - infiltration and edema of the skin (thickening of the skin fold) with or without erythema;
- 5 - erythema, severe infiltration, focal ulceration (necrosis), hemorrhages, crusting are possible.

To study the local irritating effect in the experiment, three rabbits weighing 3-3.5 kg were used, in which the test substance was instilled into the conjunctival cavity of the right eye at a concentration of 1×10^9 CFU/ml. The left eye was the control, distilled water was instilled into it. The studies were carried out according to a point system, based on the total score according to the following criteria: conjunctival and cornea hyperemia, eyelid edema, discharge. Accounting for the reaction was carried out after 24 hours and within 5 days.

The conclusion about the hazard class of the *C. rhizoplanae* 1M culture was made according to the existing classification of pathogenicity of strains [13].

All obtained experimental data were statistically processed using the STATISTICA 10 Program.

Results and discussion

The biological method is considered environmentally friendly and is an integral part of an integrated plant protection system. Strains that limit the number of phytopathogenic fungi are the basis for the creation of biological products. We conducted a study of the antagonistic activity of the *C. rhizoplanae* 1M strain against *Fusarium mung* bean blight pathogens, which showed that this strain suppresses the development of *F. oxysporum*, *F. equiseti*, and *F. tricinctum* isolated from affected mung bean seeds. The diameter of the growth inhibition zones for *F. oxysporum*, *F. equiseti*, and *F. tricinctum* by strain *C. rhizoplanae* 1M was 22.3 ± 2.0 , 25 ± 0.36 , and 27.3 ± 2.5 mm, respectively (table 1).

Table 1 - Antagonistic activity of the *C. rhizoplane* 1M strain against pathogens of *Fusarium* rot of mung bean

Test – microorganism	Inhibition zone diameter test microorganism, mm
<i>F. oxysporum</i>	22,3±2,0
<i>F. equiseti</i>	25±0,36
<i>F. tricinctum</i>	27,3±2,5
Control Maze medium	0

It was previously determined that the main compounds of the *C. rhizoplane* 1M strain are acetoin and 2,3-butanediol, the content of which in the culture liquid was 78.5±2.0% and 16.6±2.9%, respectively [9]. These compounds were tested for antagonistic activity against *Fusarium* pathogens: *F. oxysporum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* (table 2).

Table 2 - Antagonistic activity of acetoin and 2,3-butanediol against pathogens of *Fusarium* rot of mung bean

Sample	Concentration, mg/l	Diameter of the zone of inhibition growth of the test microorganism, mm		
		<i>F. oxysporum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>F. tricinctum</i>
acetoin	500	19,0±1,0	11,7±2,8	13,7±1,5
	250	6,3±1,5	7,7±1,5	6,0±1,0
2,3-butanediol	500	14,3±3,7	21,0±3,6	11,3±2,3
	250	6,7±2,8	13,3±2,8	7,3
Control 96% ethanol		0	0	0
Control water		0	0	0

Volatile compounds such as alkanes, aldehydes, ammonia, esters, ketones, sulfides, and terpenoids produced by some rhizobacteria are known to exhibit antifungal activity against phytopathogens, including *F. oxysporum* and *R. solani*. In our study, a decrease in the growth of pathogens of fusariosis was observed in the presence of acetoin and 2,3-butanediol (table 2). At the same time, the concentration of 500 mg/l of both substances was more effective. The diameter of the zones of inhibition of growth of *F. oxysporum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* in the variant with acetoin at a concentration of 500 mg/l was 19.0, 11.7 and 13.7 mm, respectively. The diameter of the growth inhibition zones of *F. oxysporum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* in the variant with 2,3-butanediol at a concentration of 500 mg/l was 14.3, 21.0 and 11.3 mm, respectively.

Based on the data obtained, the *C. rhizoplane* 1M strain is promising as a basis for creating a biological product to stimulate the growth of mung bean (*Vigna radiata*) and protect against *Fusarium*. For further development and application of a biopreparation based on a strain, it is necessary to assess its biosafety for the environment. In this regard, we assessed the factors of pathogenicity (toxicity) and allergenicity of the strain. The study of the virulence of the strain showed that with intraperitoneal administration of a suspension of the *C. rhizoplane* 1M strain at concentrations from 10^3 to 10^7 CFU/ml, the animals were healthy. There was a good appetite, mobility. At concentrations of 10^9 and 10^{11} CFU/ml, two animals fell ill. Oral administration of the strain *C. rhizoplane* 1M, after 2 days, the incidence of one animal in the variant with a concentration of 10^9 CFU/ml, and two animals in the variant with a concentration of 10^{11} CFU/ml was noted. Affected animals showed a decrease in appetite and mobility, and also had ruffled fur. On the 5th day the animals recovered. On the 15th day, the death of recovered animals was not observed (table 3).

Table 3 - Results of the study of acute toxicity of the culture of *C. rhizophlane* with intraperitoneal and oral administration to mice

Quantity of animals	Method injections	Concentration <i>C. rhizophlane</i> (CFU/ml)	Sick animals	Lethality of animals	Quantity surviving animals
8	In/abdomen	10^3	0	0	8 ± 0
8	In/abdomen	10^5	0	0	8 ± 0
8	In/abdomen	10^7	0	0	8 ± 0
8	In/abdomen	10^9	2 ± 0	0	8 ± 0
8	In/abdomen	10^{11}	2 ± 0	0	8 ± 0
8	In/abdomen	The control physical solution	0	0	8 ± 0
8	orally	10^3	0	0	8 ± 0
8	orally	10^5	0	0	8 ± 0
8	orally	10^7	0	0	8 ± 0
8	orally	10^9	1 ± 0	0	8 ± 0
8	orally	10^{11}	2 ± 0	0	8 ± 0
8	orally	The control physical solution	0	0	8 ± 0

In the study of the allergenic effect, pale pink erythema was observed in the test guinea pigs at the site of application of the *C. rhizophlane* 1M strain to their skin, at a concentration of 10^6 CFU / ml, which indicated a weak allergenic effect, which disappeared on the second day after application. With the injection of the studied culture into the conjunctiva of the eye of rabbits, one of the three had a weak positive reaction in the form of an injection of the vessels of the sclera and cornea, mucous secretions in the corners of the eyes. On the second day of observations, the above phenomena in animals completely stopped, and for the next 5 days no deviations from the physiological norm were observed, respectively, the studied strain does not have a local irritating effect. Based on the existing classification of determining pathogenicity (toxicity) and allergenicity factors of strains, the culture of *C. rhizophlane* 1M belongs to the 4th hazard class, and is not pathogenic for warm-blooded organisms.

Thus, it has been established that the *C. rhizophlane* 1M strain and its metabolites acetoin and 2,3-butanediol have a fungicidal effect against *Fusarium* mung bean (*Vigna radiata*) pathogens. The diameter of the growth inhibition zones for *F. oxysporum*, *F. equiseti*, and *F. tricinctum* by strain *C. rhizophlane* 1M was 22.3 ± 2.0 , 25 ± 0.36 , and 27.3 ± 2.5 mm, respectively. The reduction in pathogen growth by its metabolites acetoin and 2,3-butanediol was greatest at 500 mg/mL. The diameter of the zones of inhibition of growth of *F. oxysporum*,

F. equiseti and *F. tricinctum* in the variant with acetoin at a concentration of 500 mg/l was 19.0, 11.7 and 13.7 mm, respectively. The diameter of the growth inhibition zones of *F. oxysporum*, *F. equiseti* and *F. tricinctum* in the variant with 2,3-butanediol at a concentration of 500 mg/l was 14.3, 21.0 and 11.3 mm, respectively. Evaluation of the pathogenicity (toxicity) and allergenicity factors of the strain showed its safety, and the previously established growth-stimulating activity of the strain and its metabolites in relation to mung bean seedlings indicates its promising use as a basis for creating a polyfunctional biological product that has a complex effect on both mung bean pathogens and mung bean sprouts and stimulation of plant growth.

References:

- 1 Oberai M., Khanna V. Mung bean rhizobacteria antagonist to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*// *Acta scientific microbiology*. -2019. -Vol. 2, No. 8. - P. 82-90.
- 2 Sun S., Zhu L., Sun F., Duan C., Zhu Zh. Pathotype diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *mungicola* causing wilt on mungbean (*Vigna radiata*)// *Crop and Pasture Science*. - 2020. - Vol.71, No.10. P. 873-883. <https://doi.org/10.1071/CP20164>
- 3 Naseri B. Bean production and fusarium root rot in diverse soil environments in Iran// *J. Soil Sci. Plant Nutr*. -2014. -Vol.14, No.1.
- 4 Eliane Divina de Toledo-Souza, Pedro Marques da Silveira, Adalberto Corrêa Café-Filho, Murillo Lobo Junio *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system// *Pesq. agropec. bras.*, Brasília -2012. - Vol.47, No.8. - P.1031-1037.
- 5 Kalantari, S., Marefat, A., Naseri, B., Hemati, R. 2011. Biocontrol of bean *Fusarium* root rot using soil microbia in Zanjan province// *The First Congress of Modern Agricultural Sciences and Technologies*. Zanjan University, Zanjan, Iran. – 2011. -P. 240-243.
- 6 Whipps J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere// *Journal of Experimental Botany*. - 2001. - Vol. 52, Issue suppl1. - P. 487–511.
- 7 Rodríguez-Navarro D., Oliver M., Contreras Al., Ruiz-Sainz J. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy for Sustainable Development*// Springer Verlag/EDP Sciences/INRA. - 2011. - No.31 (1). - P.173-190.
- 8 Bernard R. Glick *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*// Hindawi Publishing Corporation Scientica. - 2012. - Article ID 963401. - 15 pages.
- 9 Akhtar m. S., Shakeel U., Siddiqui Z. A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium* sp. on lentil// *Turk J Biol*. - 2010. - No. 4. - P. 1-7
- 10 Shemshura O.N., Shemsheeva Zh.N., Sadanov A.K., Alimzhanova M.B., Daugaliyeva S.T., Mombekova G.A., Rakhmetova Zh.K. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Chryseobacterium rhizoplanae* isolated from *Vigna radiata*// *Eco. Env. & Cons.*- 2019. - No. 25(2). - P. 807-812.
- 11 Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S., *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*// *J. Pharm. Anal.* - 2016. - No.6. - P. 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- 12 Birger M.O. «Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniia» M.,1982.163-168 s.
- 13 Metodicheskie ukazaniia po eksperimental'nomu obosnovaniiu PDK mikroorganizmov-produtsentov i sodержashchikh ikh gotovykh form preparatov v ob'ektakh proizvodstvennoi i okruzhaiushchei sredy». - 1991 g. N 5789/1-91. – 20 s.

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Плата за публикацию статей не взимается.

Представленные для опубликования материалы должны удовлетворять следующим требованиям:

Содержать результаты оригинальных научных исследований по актуальным проблемам в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии, ранее не опубликованные и не предназначенные к публикации в других изданиях.

Все статьи принимаются и публикуются одновременно на двух языках (казахском и английском, или русском и английском).

Статьи принимаются в электронном виде через профиль автора на сайте imv-journal.kz.

При невыполнении формальных требований, статья к публикации не принимается.

Статьи поступившие в редакцию журнала могут быть проверены с помощью системы [Антиплагиат](#). В случае, если результат проверки выявляет некорректно оформленные заимствования, статья может быть отклонена.

При выполнении формальных требований, статья направляется на рассмотрение членам редколлегии, имеющим ученую степень в научной области, соответствующей содержанию статьи. При этом редакция определяет соответствие статьи профилю журнала, требованиям к оформлению. При соответствии вышеуказанным требованиям направляет ее на рецензирование стороннему специалисту, обладающему высокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению, имеющему ученую степень PhD, доктора или кандидата наук.

К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в одном отделе или департаменте учреждения, где выполнена работа. Рецензент выносит решение о возможности опубликования

Окончательное решение о целесообразности публикации принимается Редакционной коллегией в соответствии с рекомендациями рецензентов.

После принятия Редакционной коллегией решения о допуске статьи к публикации ответственный редактор журнала информирует об этом автора и указывает сроки публикации.

1. Присланные материалы должны содержать:

- Материалы статьи (файлу со статьей присваивается имя по фамилии первого автора).
- Сведения об авторах (фамилия, имя, отчество, ученая степень, звание, должность, место работы, контактные телефоны, электронные адреса (e-mail), идентификационный номер (ORCID)).
- Отсканированное сопроводительное письмо.

– 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

772304585132

0 2

